

Université de Montréal

**Étude des mécanismes moléculaires induits par Sonic hedgehog
lors du guidage axonal des neurones commissuraux de la moelle épinière**

Par
Jessica My Trang PHAM

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
M.Sc. en Biologie moléculaire

avril 2009

© Jessica My Trang Pham, 2009

Université de Montréal
Faculté de études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**« Étude des mécanismes moléculaires induits par Sonic hedgehog
lors du guidage axonal des neurones commissuraux de la moelle épinière »**

présenté par :
Jessica My Trang Pham

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-François Côté (président rapporteur)
Dr. Frédéric Charron (directeur de recherche)
Dr. Annie Angers (membre du jury)

RÉSUMÉ

Le morphogène Sonic hedgehog (Shh) est requis pour le guidage axonal des neurones commissuraux lors du développement de la moelle épinière, phénomène impliquant des événements de réorganisation du cytosquelette d'actine. Bien qu'il soit généralement admis que le cytosquelette d'actine soit régulé via les petites GTPases de la famille Rho, un effet de Shh sur ces protéines clés n'a jamais été observé dans aucun contexte physiologique. Nous démontrons que Shh active les petites GTPases Rac1 et Cdc42, tant en lignées cellulaires qu'en culture primaire de neurones commissuraux embryonnaires. Cette activation de Rac1 et Cdc42 est rapide (de l'ordre de 20 minutes) et donc, compatible avec les effets de guidage induits par Shh sur les neurones commissuraux. En parallèle, nous avons étudié la protéine Boc, qui est un récepteur de Shh requis pour le guidage axonal des neurones commissuraux. Nous avons observé que Shh induit une augmentation de la phosphorylation en tyrosine de la protéine Boc, de façon dépendante de l'activité de l'effecteur Smoothened et des kinases de la famille Src (SFK), constituant ainsi une piste pour expliquer comment Shh induit son effet jusqu'aux petites GTPases Rac1 et Cdc42. Ces résultats contribuent à raffiner notre compréhension de la transduction cellulaire induite par Shh lors du guidage axonal des neurones commissuraux.

Mots clés: Shh, Cdc42, Rac1, GTPase(s), neurones commissuraux, Boc, phosphorylation en tyrosine, kinases de la famille Src (SFK), Smoothened

ABSTRACT

Sonic hedgehog (Shh) is required for axon guidance of commissural neurons during spinal cord development, which involves reorganization of the actin cytoskeleton. Even if it is shown that this process is regulated by small Rho GTPases, an effect of Shh on these key proteins has not been clearly demonstrated. In this study, we show that Shh activates the small GTPases Rac1 and Cdc42, both in cell line models and primary cultures of embryonic commissural neurons. This activation of Rac1 and Cdc42 occurs rapidly (i.e. 20 minutes), which is compatible with the guidance effects of Shh on commissural neurons. In parallel, we studied the Boc protein, which is a Shh receptor required for commissural axon guidance. We observed a Shh-mediated increase of tyrosine phosphorylation on the Boc protein (which is a Shh receptor required for axon guidance) that is dependent on the activities of the effector Smoothed and the Src Family Kinases (SFK). This contributes to our understanding of how Shh induces its effect on Rac1 and Cdc42. Furthermore, these results taken together help refine our understanding of the signal transduction mediated by Shh during axon guidance of commissural neurons.

Keywords: Shh, Cdc42, Rac1, GTPase(s), commissural neurons, Boc, tyrosine phosphorylation, Src Family Kinases (SFK), Smoothed

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	iii
ABSTRACT AND KEYWORDS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xi
REMERCIEMENTS	xii
CHAPITRE I : INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1. INTRODUCTION À LA NEUROLOGIE	2
1.1. Regard historique sur l'évolution des neurosciences	2
1.2. Organisation du système nerveux	3
1.2.1. Le neurone	3
1.2.2. Création de réseaux neuronaux.....	4
2. SPÉCIFICATION DU DESTIN CELLULAIRE DES NEURONES DU TUBE NEURAL.....	4
2.1. Genèse des neurones du tube neural	4
2.1.1. Formation du tube neural	4
2.1.2. Différenciation des neurones du tube neural	5
3. LA VOIE SONIC HEDGEHOG CANONIQUE.....	6
3.1. Rôles de Sonic hedgehog	6
3.2. Regard historique sur la découverte de la protéine Hedgehog	7
3.2.1. Découverte de Hedgehog.....	7
3.2.2. Découverte de Sonic Hedgehog	8
3.3. Molécules centrales de la voie canonique	8
3.3.1. Hedgehog et Sonic hedgehog.....	9
3.3.2. Patched	10
3.3.3. Smoothened	11
3.3.4. Costal-2	12
3.3.5. Fused	12
3.3.6. « Suppressor of Fused » (SuFu)	13
3.3.7. Cubitus interruptus et les facteurs Gli	13
3.4. Molécules modulant la voie canonique (non-exclusives à la voie Shh)	13
3.4.1. Protéine Kinase A	14
3.4.2. « Casein Kinase I » (CKI)	15
3.4.3. « Glycogen Synthase Kinase 3 » (GSK3)	15
3.4.4. « G-protein-coupled receptor kinase 2 » (GRK2)	16
3.4.5. β -arrestine 2	16
3.4.6. Rab23	17
3.5. Transduction cellulaire par la voie canonique	17
3.5.1. La liaison de Shh à Patched induit l'activation de Smoothened	17
3.5.2. Transduction du signal entre Smoothened et Ci/Gli	18
3.5.3. Transcription des gènes cibles via l'activation de Ci/Gli	19
3.6. Molécules plus récemment impliquées dans la voie Shh canonique	19
3.6.1. « Missing In Metastasis » (MIM)	19
3.6.2. Récepteurs à Shh	20
3.6.2.1. Hip	20
3.6.2.2. Glypicanes	20
3.6.2.3. Mégaline	21
3.6.2.4. Gas1	22
3.6.2.5. Cdo	22
3.6.2.6. Boc	23

4. GUIDAGE AXONAL	24
4.1. Notion de guidage axonal.....	24
4.2. Les neurones commissuraux du tube neural utilisés comme modèle pour l'étude du guidage axonal	25
4.2.1. Les neurones commissuraux comme système modèle.....	25
4.2.2. L'identification de molécules de guidage à l'aide du système modèle des neurones commissuraux	26
4.3. Molécules associées au guidage axonal des neurones commissuraux	26
4.3.1. Guidage axonal médié par les Sémaphorines	27
4.3.2. Guidage axonal médié par les Slits.....	28
4.3.3. Guidage axonal médié par les Éphrines.....	28
4.3.4. Guidage axonal médié par les Nétrines	29
4.3.5. Guidage axonal médié par les BMP	30
4.3.6. Guidage axonal médié par les Wnt	30
4.3.7. Guidage axonal médié par Sonic hedgehog	31
5. REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE	33
5.1. Composantes du cytosquelette	33
5.1.1. Filaments intermédiaires	33
5.1.2. Microtubules	33
5.1.3. Actine	33
5.1.4. Implications des composantes du cytosquelette lors du guidage axonal	34
5.2. Dynamiques de remodelage de l'actine.....	35
5.3. Régulation du remodelage d'actine par les petites GTPases Rho	35
5.3.1 Fonctionnement des protéines de type GTPase	35
5.3.2. Les petites GTPases de la famille Rho	36
5.3.2.1. RhoA	37
5.3.2.2. Cdc42	37
5.3.2.3. Rac1	38
5.3.3. Implications des petites GTPases Rho dans le guidage axonal	38
5.4. Régulation des petites GTPases Rho par les protéines GAP et les protéines GEF	39
5.4.1. Les régulateurs négatifs des petites GTPases Rho (les protéines GAP)	40
5.4.2. Les régulateurs positifs des petites GTPases Rho (les protéines GEF)	41
5.4.2.1. Les facteurs GEF de la famille Dbl	41
5.4.2.2. Les facteurs GEF de la famille DOCK	41
5.4.3. Implications des régulateurs des petites GTPases Rho dans le guidage axonal	42
5.4.3.1. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Sémaphorines	43
5.4.3.2. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Slits	43
5.4.3.3. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Éphrines	44
5.4.3.4. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Nétrines	44
5.4.3.5. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par NGF	45
5.4.3.6. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par Sonic hedgehog	45
6. LA VOIE SONIC HEDGEHOG NON-CANONIQUE	45
6.1. Molécules impliquées dans la voie Shh non-canonique	45
6.1.1. La famille des kinases Src	45
6.1.1.1. Activation des SFK	46
6.1.1.2. Substrat des SFK contrôlant le remodelage du cytosquelette	47
6.2. Transduction cellulaire par la voie non-canonique	49
7. RAISONNEMENT ET OBJECTIFS	50

CHAPITRE II: « SONIC HEDGEHOG RAPIDLY STIMULATES THE ACTIVITY OF THE SMALL RHO GTPASES RAC1 AND CDC42 IN COMMISSURAL NEURONS» ...	51
CONTRIBUTION DES CO-AUTEURS	53
RÉSUMÉ	54
ABSTRACT.....	55
INTRODUCTION	56
RESULTS	58
DISCUSSION	62
EXPERIMENTAL PROCEDURES	65
ACKNOWLEDGEMENTS	69
REFERENCES	70
FIGURE LEGENDS AND FIGURES	73
SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND AND SUPPLEMENTARY FIGURE	81
CHAPITRE III: DISCUSSION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	83
1. RETOUR SUR LA DÉMONSTRATION DE L'EXISTENCE DE LA VOIE NON-CANONIQUE.....	84
2. ANALYSE DES RÉSULTATS OBTENUS ET DES ACQUIS FOURNIS DANS LA LITTÉRATURE	85
2.1. Boc est un récepteur pour Shh	85
2.2. La queue cytoplasmique de Boc est phosphorylée en tyrosine de façon basale	85
2.2.1. Tyrosine(s) phosphorylée(s) de façon basale	86
2.2.2. Interactions avec la queue cytoplasmique de Boc	87
2.2.2.1. Elmo1	87
2.2.2.2. L'ubiquitine	88
2.2.2.3. β -arrestines	89
2.2.2.4. Fyn, une kinase de la famille Src (SFK)	90
2.3 Boc est phosphorylé après stimulation à Shh	91
2.4. Les SFK sont requises pour la phosphorylation de Boc et pour le guidage	92
2.5. Smo est requis pour la phosphorylation de Boc et pour le guidage	93
2.6. Shh induit une activation rapide des petites GTPases Cdc42 et Rac1	93
3. RÉCONCILIATION DES CONCEPTS ABORDÉS	95
3.1. Justifications des modèles cellulaires utilisés	95
3.2. Résumé de la compréhension du modèle proposé	95
RÉFÉRENCES	xiii

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

CHAPITRE I :

Figure 1. Dessin décrivant des observations faites sur des coupes de mammifères après coloration de Golgi	3
Figure 2. Schéma représentant les étapes survenant lors de la neurulation, vues en sections transversales d'un embryon vertébré	5
Figure 3. Phénotype du mutant <i>hedgehog</i> chez la larve de <i>Drosophila melanogaster</i>	7
Figure 4. Schéma illustrant le fonctionnement général de la voie Sonic hedgehog (Shh) canonique	9
Figure 5. Schéma plus détaillé illustrant la transduction de la voie Sonic hedgehog (Shh) canonique	14
Figure 6. Les cônes de croissance, ainsi que les neurones commissuraux ont été caractérisés par Ramon y Cajal	24
Figure 7. Schéma représentant la migration de l'axone d'un neurone commissural lors de l'embryogenèse	25
Figure 8. Schéma illustrant quelques voies de signalisation utilisées par différents systèmes de guidage pour contrôler le cytosquelette d'actine	43
Tableau I: Effecteurs des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42	36
Tableau II: Protéines GAP et GEF régulatrices des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42	40

CHAPITRE II :

Figure 1. Shh stimulation increases Cdc42 and Rac1 activity in cultured cell lines	77
Figure 2. Shh stimulation activates Cdc42 and Rac1 in primary culture of commissural neurons	78
Figure 3. The cytoplasmic tail of Boc is tyrosine-phosphorylated	79
Figure 4. Shh stimulation increases tyrosine phosphorylation of Boc, in a SFK- and Smoothed-dependent manner	80
Figure S1. Endogenous GTPases activity can be measured using Rac1 and Cdc42 specific antibodies	82

CHAPITRE III :

Figure 9. Schéma décrivant ce qui est connu de la transduction de la voie Shh non-canonique	98
---	----

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Actine-F	Actine en filament
Actine-G	Actine globulaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Arf	ADP ribosylation factor
Arp2/3.	Actin-Related Protein 2/3
BMP	Bone Morphogenic Proteins
Boc	Brother of Cdo
Cdc42	Cell Division Cycle 42
Cdo	Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes
Ci	Cubitus interruptus
CKI (ou CK1)	Casein Kinase I
Cos2	Costal-2
CSK	Src tyrosine kinase
Dally	Division abnormally delayed
Dbl	Diffuse B-cell lymphoma
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
Dhh	Desert hedgehog
DHR	Dock Homology Region
Dia	Diaphanous
DOCK180	Dedicator of cytokinesis
Dpl	Dally-like protein
Dpp	Decapentaplegic
Dsh	Dishevelled
Elmo1	Engulfment and Cell Motility
Eph	Erythropoietin-producing hepatocellular
ERK/MAPK	Extracellular Regulated Kinase/Mitogen Activated Protein Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FNIII	Fibronectine de type III
Fu	Fused
Fz	Frizzled
GAP	GTPase Activating Protein
Gas-1	Growth arrest specific gene-1
GDI	Guanine nucleotide-Dissociation Inhibitors
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide-Exchange Factors
Gli	Glioma-associated oncogenes
GPI	Glycosyl phosphatidylinositol
GSK3	Glycogene Synthase Kinase
GTP	Guanosine triphosphate
Hh	Hedgehog
Hip	Hedgehog Interacting Protein
HPE	Holoprosencéphalie

Ig	Immunoglobuline
Ihh	Indian Hedgehog
Ihog	Interference hedgehog
IMD	IRSp53 MIM domain
KIF	Kinesin Family members
LIMK	Lim Kinase
LRP-2	Lipoprotein Receptor-related Protein 2
MBC	Myoblast City
MIM/Beg4	Missing in Metastasis/Basal cell carcinoma-enriched gene 4
NGF	Nerve Growth Factor
NPC1	Niemann-Pick C1
p140Sra-1	Specific Rac1-associated protein
PAK	p21-activated kinase
PKA	Protéine kinase A
PoR-1	Partner of Rac
PRD	Proline Rich Domain (domaines riches en prolines)
Ptc	Patched
PTPδ (ou RPTPδ)	Tyrosine phosphatase δ
Rac	Ras-regulated C3 botulinum toxin substrate
Ran	Ras-related Nuclear protein
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
Rho	Ras homologous
RND	Resistance-Nodulation cell Division
Robo	Roundabout
ROCK	Rho-kinases
RTK	Récepteurs tyrosine-kinases
SFK	Src family kinases (kinases de la famille Src)
SH2	Src homology 2
SH2	Src homology 3
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SNC	Système nerveux central
srGAP	Slit-Robo srGAP
SuFu	Suppressor-of-Fused
TGF-b	Transforming Growth Factor-b
Tiam-1	T-Lymphoma invasion and metastasis-1 protein
UNC5	Uncoordinated 5
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WH2	Wasp-homology 2

À mes grands-mères,
Fernande Doucet et Truong Thi Them

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidée dans le cadre de mon projet, plus particulièrement Mélanie Laurin, pour son aide précieuse touchant mes travaux sur les GTPases, ainsi que Denis Faubert et Josée Champagne pour le travail en spectrométrie.

Je voudrais aussi remercier les membres du laboratoire, qui forment une équipe incroyable, où chacun est toujours prêt à aider l'autre, tant scientifiquement que personnellement. Notre groupe est réellement fort et chacun de vous en est la cause, merci pour tout... Je voudrais remercier Luisa Izzi pour avoir apporté des commentaires constructifs sur le manuscrit du présent ouvrage, en plus d'avoir été d'un support moral considérable. Un merci particulier à Dominique Laniel, avec qui j'évolue depuis mon entrée au labo et qui a toujours été (et restera toujours) ma *partner* ultime. Je remercie également Steves Morin qui, en plus de m'avoir enseigné tout ce qu'il sait, a su me montrer tout ce que je peux faire lorsque je crois en moi.

Finalement, je remercie mon directeur de recherche, Frédéric Charron, non seulement pour m'avoir donné la chance de travailler dans un laboratoire chaleureux et stimulant, mais également pour m'avoir inculqué les préceptes d'une science bien faite. En voyant le chemin incroyable que j'ai parcouru depuis mes débuts au laboratoire, je réalise que le sérieux avec lequel Frédéric considère son rôle de mentor fait de moi une scientifique que je n'aurais pas su être ailleurs.

Un merci tout spécial pour Dariel Ashton-Beaucage qui m'apporte des avis éclairés et rationnels concernant mes travaux scientifiques et qui de plus, m'a toujours aidée et supportée dans tous mes projets (en plus de me supporter tout court...) De façon plus personnelle, je voudrais aussi remercier mon amie de toujours, Ngoc Anh Nguyen, ainsi ma famille, Valérie, Allan et mes parents, pour leurs incessantes preuves d'amour et leurs encouragements sincères.

CHAPITRE I :
INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE I

1. INTRODUCTION À LA NEUROLOGIE

1.1. Regard historique sur l'évolution des neurosciences

L'étude du système nerveux puise ses origines dans l'aube de l'humanité. Le crâne d'un individu ayant vécu pendant l'ère néolithique porte les traces d'une chirurgie crânienne ayant été réalisée avec succès, puisque le sujet montre une cicatrisation de son opération (Alt et al., 1997). Les premières preuves écrites d'un lien symptômes-lésions cérébrales remontent aux écrits de l'Égypte antique, qui ne considéraient cependant pas le cerveau comme le siège de l'intelligence. Cette école de pensée était soutenue dans certains écrits grecs anciens et s'opposait aux vues d'Hippocrate (460-370 av. J.-C.) qui défendait la théorie selon laquelle le cerveau est l'organe essentiel à l'intelligence (Bear et al., 2002). Cette théorie fut corroborée par Galien (130-200), un médecin romain ayant observé les conséquences dramatiques induites par des lésions cérébrales chez ses patients gladiateurs. Il introduit cependant le principe erroné selon lequel le cerveau communique aux muscles via un échange de fluides (Dunn, 2003). Cette théorie resta prédominante jusqu'à la Renaissance et fut d'ailleurs défendue par de grands penseurs de l'époque des Lumières, tel que Descartes (1596-1650) (Bear et al., 2002). Il fallut attendre jusqu'à l'avènement de connaissances sur l'électricité (Franklin, en 1751) pour sortir de ce dogme. Constatant que les muscles répondent à des stimuli électriques (Galvani, en 1771), les scientifiques conclurent que les muscles et le cerveau communiquent entre eux via des signaux électriques. On parlait encore toutefois alors d'un « réseau nerveux », où les unités nerveuses fusionnaient les unes aux autres, de façon comparable au système sanguin. Cette conception (erronée) dût affronter l'avènement de connaissances supportant l'existence d'unités individuelles, nommées « cellules », composant tout tissu ou organisme. La « théorie cellulaire » fut soutenue grâce à l'apport de différents travaux, réalisés notamment par Hooke en 1665, Leeuwenhoek en 1674, Schwann et Schleiden en 1838, ainsi que Virchow en 1858. À la fin du XIXe siècle, Nissl et Golgi élaborèrent des techniques d'histologie permettant de colorer respectivement certaines structures de la cellule nerveuse (désormais appelé le « neurone »), ou une portion de la population neuronale (voir figure 1, à gauche) (Golgi et al., 2001 (1886)). La technique de coloration de Golgi fut reprise par Cajal, qui décrivit des circuits nerveux établis entre les neurones et dirigea ses travaux pour défendre la « doctrine du neurone », selon laquelle le neurone est l'unité à la

CHAPITRE I

base du système nerveux, tant au niveau structurel que fonctionnel (voir figure 1, à droite). Golgi et Cajal se virent mériter conjointement le prix Nobel de médecine en 1906 pour leurs travaux.

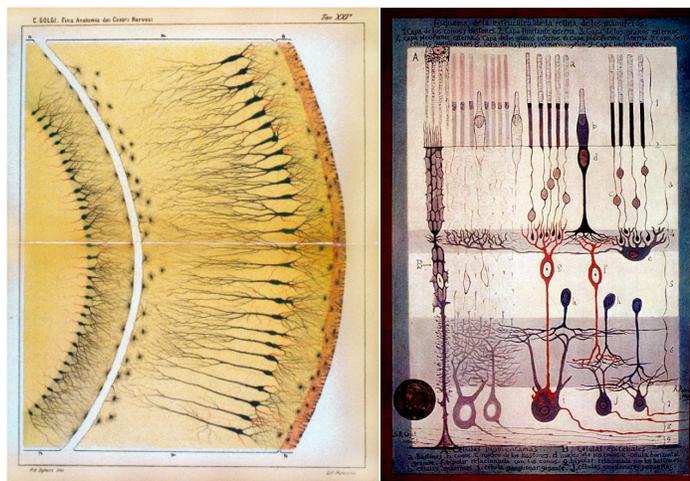


Figure 1. Dessin décrivant des observations faites sur des coupes de mammifères après coloration de Golgi. À gauche : dessin réalisé par Camillo Golgi publié dans « On the Fine Structure of the Central Organs of the Nervous System » (1886) montrant les détails structurels d'une coupe d'*Hippocampi major* de lapin. À droite : dessin réalisé par Santiago Ramón y Cajal publié dans l'ouvrage « Structure of mammalian retina » en 1900, représentant les divers types cellulaires contenus dans les couches formant la rétine.

1.2. Organisation du système nerveux

Les découvertes de cette époque, ainsi que les travaux subséquents jusqu'à nos jours, ont permis de mieux cerner comment est organisé le neurone et comment se forment les connections nerveuses.

1.2.1. Le neurone

Le neurone est composé de trois principales structures : les dendrites, le soma et l'axone. Les dendrites reçoivent la stimulation nerveuse (provenant d'autres neurones) et la transmettent vers le soma de la cellule nerveuse. Ils peuvent être ornés de structures appelées « épines dendritiques », spécialisées dans la « réception » d'influx provenant d'un autre neurone. Les dendrites confèrent aux neurones un aspect d'arborisation très typique : elles sont disposés tout autour du soma, auquel elles sont rattachées.

Le soma tient lieu de corps cellulaire du neurone et contient le noyau ainsi que les organelles nécessaires au bon fonctionnement de l'entité cellulaire. Le soma est comparable en de nombreux point à la plupart des cellules animales.

CHAPITRE I

L'axone, en revanche, est une structure spécifique à la cellule nerveuse, étant hautement spécialisé dans la transmission de l'influx nerveux.

1.2.2. Création de réseaux neuronaux

L'axone prend une importance toute particulière lors du développement nerveux embryonnaire, puisqu'il s'agit de la partie du neurone devant naviguer à travers un environnement complexe pour atteindre le tissu cible. Afin de former des réseaux synaptiques fonctionnels, les cellules nerveuses doivent passer une série d'étapes cruciales.

(1) La genèse cellulaire doit évidemment être effectuée correctement afin de générer des neurones fonctionnels. Ces neurones doivent également migrer au bon endroit, dans le compartiment qui leur est destiné. (2) Une fois le neurone différencié, son axone se dirige vers sa cible en subissant l'effet de divers signaux de guidage présents le long de sa route, au sein de l'embryon en développement. (3) Une fois en contact avec le tissu-cible (pouvant être une autre cellule nerveuse ou un muscle), le neurone doit se connecter de façon efficace et être en mesure de transmettre un influx nerveux, sans quoi il ne survivra pas.

Dans le cadre de l'étude des mécanismes moléculaires induits par Sonic hedgehog lors du développement embryonnaire des neurones, les étapes de genèse des neurones et de guidage axonal sont pertinentes et seront donc décrites plus en détails.

2. SPÉCIFICATION DU DESTIN CELLULAIRE DES NEURONES DU TUBE NEURAL

2.1. Genèse des neurones du tube neural

2.1.1. Formation du tube neural

Chez les chordés, l'embryon se développe à partir de trois feuilletts primitifs de cellules, appelés l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme mis en place lors de la gastrulation. L'endoderme engendre les organes digestifs, une partie des structures respiratoires, la vessie et certaines glandes. Le mésoderme donne naissance aux organes internes, (excluant le système nerveux et les structures issues de l'endoderme), comprenant entre autres la notocorde (aussi appelée la « corde ») et les somites (générant muscles, vertèbres et derme). L'ectoderme engendre le système nerveux ainsi que les tissus externes (comprenant l'épiderme). Les cellules de l'ectoderme mises en présence du facteur « Bone Morphogenic

CHAPITRE I

Protein 4 » (BMP-4) se développent en « ectoderme externe », duquel naîtront les cellules épidermales. En absence de BMP-4 ou en présence de signaux inhibiteurs des BMP-4, l'ectoderme engendre le « neuroectoderme » (comprenant les cellules de la plaque neurale et de la crête neurale) lors d'une étape appelée la neurulation (Albert et al., 2002c; Basch et al., 2004; Lee and Jessell, 1999; Stern, 2005).

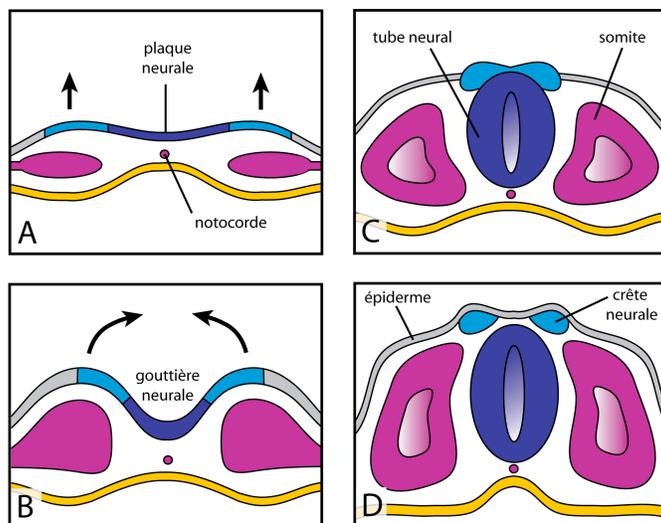


Figure 2. Schéma représentant les étapes survenant lors de la neurulation, vues en sections transversales d'un embryon vertébré. (A) Les trois feuillets primitifs sont disposés en couches, l'un sur l'autre : l'ectoderme du côté dorsal (en bleu et gris), l'endoderme du côté ventral (en jaune) et le mésoderme au centre (en rose). Lors de cette étape, il y a formation de la plaque neurale, comprise dans le neuroectoderme (domaines illustrés en bleu). (B) Il y a ensuite formation de la gouttière neurale, induite par courbure du neuroectoderme. (C) Puis s'en suit la fusion des plis de la gouttière neurale, où on assiste à la formation du tube neural. (D) L'épiderme recouvre ensuite le neuroectoderme, en étendant son domaine au-dessus des cellules de la crête neurale.

La neurulation s'initie par la formation de la plaque neurale. Ensuite, les cellules de la crête neurale, situées entre les cellules de la plaque basale et de l'épiderme, induisent une courbure et puis une invagination du neuroectoderme, constituant la gouttière neurale. Il y a ensuite fusion des replis et fermeture de la gouttière neurale, engendrant ainsi la formation du tube neural. L'épiderme recouvre ensuite le neuroectoderme. Les cellules de la crête neurale engendreront système nerveux périphérique tandis que celles du tube neural donneront naissance au système nerveux central (voir figure 2).

2.1.2. Différenciation des neurones du tube neural

Une fois le tube neural formé, les cellules qui le composent sont encore des progéniteurs non-différenciés (neuroblastes) ; ils se développeront cependant ensuite en une variété de classes distinctes de neurones selon leur position dans le tube neural, sous l'influence de différentes molécules émises lors de l'embryogenèse.

Les mécanismes engendrant ces divers types neuronaux ont été étudiés depuis plusieurs décennies. Les travaux de l'époque ont noté que le destin des neuroblastes du tube neural pouvait être influencé par la présence d'un implant de notocorde ectopique. Du côté du tube

CHAPITRE I

neural près de l'implant, il y avait alors formation d'une seconde structure analogue à la plaque basale (van Straaten et al., 1985). Il fut ensuite plus clairement démontré que la notocorde contrôle le destin cellulaire des neuroblastes pour ainsi engendrer la plaque basale (Placzek et al., 1990b). Une fois formée, la plaque basale contrôle elle aussi la différenciation des neuroblastes du tube neural (Yamada et al., 1991). Ensuite fut suggéré que l'activité morphogène de ces structures devait être due à la sécrétion d'un facteur capable d'induire la différenciation (Yamada et al., 1993). L'identification du facteur en question s'est ensuite faite et correspondait à un facteur nouveau chez les vertébrés (Echelard et al., 1993), le poulet (Riddle et al., 1993) et le poisson zèbre (Krauss et al., 1993); ce facteur fut nommé « Sonic hedgehog » et s'avéra être le ligand en amont d'une voie de signalisation qui devint l'une des plus étudiées dans le domaine de la recherche développementale.

3. VOIE SONIC HEDGEHOG CANONIQUE

3.1. Rôles de Sonic hedgehog

En plus d'induire la différenciation des neurones ventraux du tube neural, la protéine Sonic Hedgehog (Shh) possède une panoplie d'autres rôles requis lors de l'embryogenèse (Fuccillo et al., 2006; Marti and Bovolenta, 2002). Tout d'abord, Shh peut induire la différenciation des neurones dans d'autres structures du SNC, telles qu'au sein du prosencéphale, du mésencéphale et du cervelet (Fuccillo et al., 2006; Fuccillo et al., 2004; Ishibashi and McMahon, 2002). Shh a également été caractérisé pour pouvoir engendrer les oligodendrocytes, qui sont des cellules gliales du SNC (Orentas et al., 1999; Poncet et al., 1996; Pringle et al., 1996), et les neurones qui constitueront la rétine de l'œil (Huh et al., 1999; Jensen and Wallace, 1997; Zhang and Yang, 2001b). Shh a d'ailleurs un rôle double lors du développement de l'œil, puisqu'il est également en mesure d'agir sur la prolifération des cellules ganglionnaires de la rétine (Zhang and Yang, 2001a). Au cours du développement, l'action proliférative de Shh fait aussi effet sur les précurseurs des neurones granulaires du cervelet (Kenney et al., 2003). Même chez l'adulte, Shh aurait un rôle quant à la maintenance des cellules souches neuronales (Machold et al., 2003).

CHAPITRE I

Finalement, un rôle de Shh dans le guidage des axones de neurones du tube neural a aussi été caractérisé (Charron et al., 2003) et sera abordé plus en détail au cours du présent chapitre.

3.2. Regard historique sur la découverte des protéines Hedgehog

3.2.1. Découverte de Hedgehog

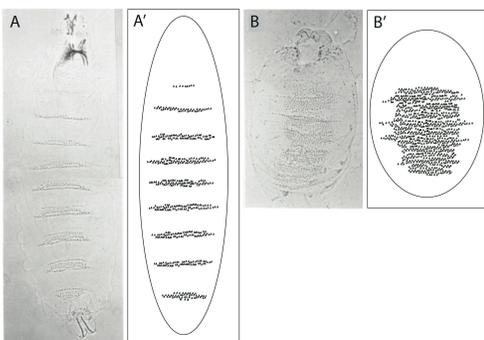


Figure 3. Phénotype du mutant *hedgehog* chez la larve de *Drosophila melanogaster*. Une larve de type sauvage présente des denticules disposés en bandes sur son abdomen (photomicrographie en A et schématisation en A'). En comparaison, chez l'embryon de drosophile mutant pour le gène *hedgehog*, les segments sont mal définis, induisant ainsi un phénotype présentant un abdomen avec des cuticules en continu, rappelant un hérisson (photomicrographie en B et schématisation en B'). Les panneaux A et B sont tirés de l'étude « Requirements for *hedgehog*, a Segmental Polarity Gene, in Patterning Larval and Adult Cuticle of *Drosophila* » parue en 1988 (Mohler, 1988).

Le gène *hedgehog* fut initialement identifié lors d'un crible, publié par Nüsslein-Volhard et Wieschaus en 1980, qui cherchaient alors à identifier des régulateurs impliqués lors du développement embryonnaire chez la drosophile. Leurs travaux permirent de mettre en évidence la pertinence d'un crible génétique pour étudier les gènes clés contrôlant le développement d'un organisme complexe. Les auteurs de l'étude se virent d'ailleurs décerner le prix Nobel en 1995, conjointement à Edward B. Lewis, pour leur contribution scientifique à la compréhension des mécanismes régulant le développement (Cohen, 1995). Dans ce crible, 15 gènes furent identifiés : *wingless*, *gooseberry*, *paired*, *even-skipped*, *odd-skipped*, *barrel*, *runt*, *engrailed*, *Kruppel*, *knirps*, *hunchback*, *cubitus interruptus*, *fused*, *patch* et *hedgehog* (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Pour certains des facteurs identifiés, le gène était déjà connu et donc déjà nommé, tel que pour *cubitus interruptus* (*ci*) qui est associé à un phénotype décrit depuis 1933 (Tiniakow and Terentieva, 1933). Par contre, certains autres gènes, identifiés pour la première fois, durent être baptisés. Ces gènes furent nommés selon le phénotype observé chez le mutant, tel que classiquement fait par les chercheurs étudiant la drosophile. Le gène *hedgehog* fut donc nommé de la sorte, car les denticules (petites structures en forme de « pics » normalement disposés en bandes sur l'abdomen de l'embryon de mouche) ne forment plus des segments

identifiés : *wingless*, *gooseberry*, *paired*, *even-skipped*, *odd-skipped*, *barrel*, *runt*, *engrailed*, *Kruppel*, *knirps*, *hunchback*, *cubitus interruptus*, *fused*, *patch* et *hedgehog* (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Pour certains des facteurs identifiés, le gène était déjà connu et donc déjà nommé, tel que pour *cubitus interruptus* (*ci*) qui est associé à un phénotype décrit depuis 1933 (Tiniakow and Terentieva, 1933). Par contre, certains autres gènes, identifiés pour la première fois, durent être baptisés. Ces gènes furent nommés selon le phénotype observé chez le mutant, tel que classiquement fait par les chercheurs étudiant la drosophile. Le gène *hedgehog* fut donc nommé de la sorte, car les denticules (petites structures en forme de « pics » normalement disposés en bandes sur l'abdomen de l'embryon de mouche) ne forment plus des segments

CHAPITRE I

chez le mutant, mais plutôt un tapis rappelant un hérisson (soit un « hedgehog » en anglais – voir figure 3). Dès lors, la protéine encodée fut appelée Hedgehog (Hh).

3.2.2. Découverte de Sonic Hedgehog

En 1993, trois études paraissant en parallèle identifièrent les orthologues de Hedgehog chez la souris (Echelard et al., 1993), le poulet (Riddle et al., 1993) et le poisson zèbre (Krauss et al., 1993), déterminant ainsi qu'il s'agissait d'un facteur évolutivement conservé (Ingham and McMahon, 2001; Kumar et al., 1996). Bien qu'un seul gène *hedgehog* soit présent chez la drosophile et le poulet, trois orthologues existent chez la souris et le poisson zèbre. Chez la souris, les trois homologues furent nommés Desert hedgehog (Dhh), Indian Hedgehog (Ihh) et Sonic Hedgehog (Shh) (Echelard et al., 1993). Dhh et Ihh furent nommés à l'image de deux espèces de hérisson, soient respectivement le hérisson du désert (*Paraechinus aethiopicus*) et le hérisson indien/hérisson à grandes oreilles (*Hemiechinus auritus*). Shh fut quant à lui nommé d'après un personnage de jeu vidéo appelé « Sonic the hedgehog ». Trois homologues sont également présents chez l'humain et portent les mêmes noms que les protéines Hedgehog murines, soient Ihh, Shh (Marigo et al., 1995) et Dhh (Kamisago et al., 1999). Le nom « Sonic hedgehog » fut d'ailleurs critiqué quand vinrent les évidences d'un rôle pour ce facteur au sein de différentes maladies graves et que le corps médical exprima un certain malaise à expliquer aux patients l'humour relié à la nomenclature de ce gène (Cohen, 2006; Maclean, 2006). Le nom a toutefois survécu à la controverse et le gène est encore aujourd'hui appelé *sonic hedgehog*.

3.3. Molécules centrales de la voie canonique

La voie Shh classique, dite la voie canonique, est responsable des effets morphogènes de Shh et comporte des acteurs dont plusieurs ont été identifiés par interaction génétique chez la drosophile (Forbes et al., 1993; Preat, 1992). De la drosophile aux mammifères, les éléments de la voie canonique sont conservés, avec la nuance que le nombre de gènes reliés varient d'une espèce à l'autre (Ruiz-Gomez et al., 2007). Toutefois, les événements de transduction du signal comportent certaines différences de la drosophile aux vertébrés. On peut cependant dire que le fonctionnement général de la voie Hh/Shh est conservé (Goodrich et al., 1996; Riobo and Manning, 2007).

CHAPITRE I

À l'état basal, la cellule sensible à Hh/Shh exprime les protéines membranaires Patched (Ptc) et Smoothened (Smo). Ptc exerce une inhibition sur Smo, gardant ainsi la voie Shh inactive. Toutefois, en présence de Shh, il y a liaison de Shh à Ptc ce qui lève l'inhibition sur Smo et rend cette dernière active. L'activation de Smo entraîne une cascade de signalisation cellulaire culminant par l'activation des facteurs Gli, responsables de la transcription des gènes induits par Shh (Ruel et al., 2007) (voir figure 4).

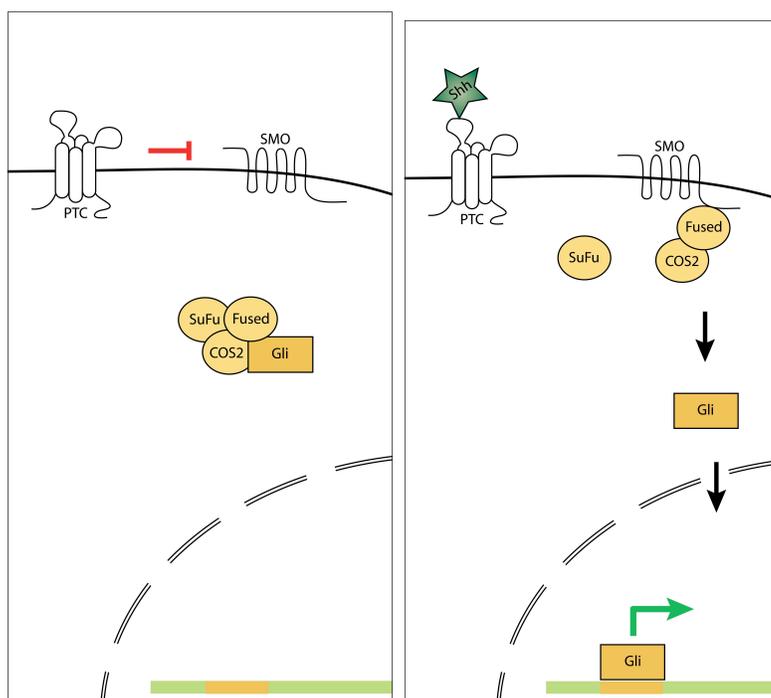


Figure 4. Schéma illustrant le fonctionnement général de la voie Sonic hedgehog (Shh) canonique. (Gauche) En absence de Shh, la protéine Patched (Ptc) exerce une répression sur Smoothened (Smo) et garde ainsi la voie inactive. (Droite) En présence de Shh, celui-ci se lie à son récepteur Ptc ; cette liaison vient lever l'inhibition de Ptc envers Smo. Smo peut déclencher une cascade cellulaire culminant par la transcription des gènes cibles de les facteurs Gli.

3.3.1. Hedgehog et Sonic hedgehog

Parmi les trois membres de la famille Hedgehog chez les mammifères, Sonic Hedgehog est la plus activement étudiée et la plus largement exprimée (Riobo and Manning, 2007). Lors de l'embryogenèse, Shh est exprimé très tôt, apparaissant à la ligne médiane du mésoderme à la fin de la gastrulation. L'expression de Shh s'étend ensuite aux structures de la ligne médiane du SNC, incluant la notocorde et la plaque basale. Shh n'est cependant pas confiné

CHAPITRE I

à ces tissus, étant aussi détecté entre autres dans les bourgeons embryonnaires qui généreront les membres de l'animal (Echelard et al., 1993).

La protéine Shh est tout d'abord synthétisée par la cellule sous forme d'un précurseur, lequel sera envoyé dans la voie sécrétrice au cours de laquelle seront subies différentes formes de modifications post-transcriptionnelles. Tout d'abord, un auto-clivage du précurseur (catalysé par la portion C-terminale de Shh) engendre un fragment N-terminal souvent appelé « N-Shh », constituant la portion active de Shh (Chang et al., 1994; Fietz et al., 1995; Lee et al., 1994; Porter et al., 1995). Cette molécule N-Shh subira l'ajout d'un cholestérol en C-terminal et une palmitoylation sur une cystéine située du côté N-terminal, avant d'être excrétée sous l'action de la protéine Dispatched A (Ma et al., 2002). Les ajouts lipidiques sont impliqués pour que se fassent correctement la multimérisation de molécules de N-Shh et l'établissement de gradient dans les tissus, en plus d'être requis pour l'efficacité de signalisation de N-Shh sur les cellules cibles (Chen et al., 2004a; Lewis et al., 2001; Li et al., 2006; Taylor et al., 2001; Zeng et al., 2001).

3.3.2. Patched

Bien qu'une seule protéine Patched (Ptc) soit présente chez la drosophile, on en retrouve deux chez les mammifères (Ptc1 et Ptc2) (Carpenter et al., 1998; Ruiz-Gomez et al., 2007). Il s'agit d'une protéine à 12 domaines transmembranaires, créant deux boucles extracellulaires; la première boucle présente entre les 1^{er} et 2^e passages transmembranaires et la deuxième boucle située entre les 7^e et 8^e passages transmembranaires (Hooper and Scott, 1989; Nakano et al., 1989). La deuxième boucle extracellulaire est responsable de l'interaction avec Hedgehog (tant pour Hh de drosophile que Shh de vertébré) (Briscoe et al., 2001; Taipale et al., 2002). En effet, Ptc est un récepteur pour Hh et Shh (Ingham et al., 1991; Stone et al., 1996) de façon évolutivement conservée (Goodrich et al., 1996).

Il s'agit toutefois d'un récepteur peu commun, puisqu'il ne présente pas d'homologie avec d'autres récepteurs connus. Ptc montre cependant une homologie avec la protéine Niemann-Pick C1 (NPC1), spécialement dans les régions transmembranaires (Carstea et al., 1997; Loftus et al., 1997). Cette protéine est impliquée dans le transport intracellulaire de lipides et s'est avérée être une pompe moléculaire transmembranaire pour les acides gras (Davies et al., 2000). Il fut ensuite constaté que NPC1 comporte une homologie avec les pompes d'efflux de type RND (Resistance-Nodulation cell Division) trouvées chez les

CHAPITRE I

bactéries (Scott and Ioannou, 2004) et qu'en fait, Ptc est encore plus similaire aux transporteurs RND qu'à NPC1 (Davies et al., 2000). Les pompes d'efflux RND sont impliquées pour l'export d'antibiotiques (Cattoir, 2004), de composés organiques toxiques, d'ions métalliques ainsi que des facteurs de nodulation et de *quorum sensing* (Taipale et al., 2002; Tseng et al., 1999).

3.3.3. Smoothened

Smo est le modulateur clé de la voie Hh, étant absolument requis pour que s'opère la transduction du signal Shh. D'ailleurs, la voie Shh est parfois appelée la « voie de signalisation Smo » (Ruiz-Gomez et al., 2007).

Un seul gène *smoothened* est retrouvé tant chez la drosophile que les vertébrés (Ruiz-Gomez et al., 2007). Ce gène encode une protéine à 7 domaines transmembranaires démontrant certaines caractéristiques communes avec les membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Alcedo et al., 1996). En s'en tenant uniquement à la structure de Smo, certains l'incluent parmi les RCPG ; concernant d'autres aspects, Smo a toutefois longtemps été considérée trop atypique pour être incluse dans cette superfamille.

Tout d'abord, les RCPG interagissent généralement directement avec un ligand, pour être ensuite activés. Dans le cas de Smo, il n'est pas clair comment celui-ci est activé, puisque le ligand (Shh) clairement identifié dans la voie ne se lie pas directement à Smo, mais utilise plutôt Ptc comme récepteur. Le ligand potentiel de Smo serait plutôt une molécule liée aux cholestérols (voir section 3.5.1). Ensuite, le couplage de la protéine aux protéines G est requis pour qu'un récepteur fasse partie de la famille des RCPG (comme son nom l'indique). Cependant, plusieurs sources ont indiqué des résultats contradictoires concernant Smo, suggérant que les protéines G sont parfois requises (Ogden et al., 2008), parfois dispensables pour l'activation de la voie Shh (Low et al., 2008; Ruiz-Gomez et al., 2007). Cependant, il a récemment été démontré chez la drosophile que $G\alpha_i$ (une sous-unité de la protéine G) agit directement en aval de Smo pour réguler les niveaux d'AMP cyclique en réponse à Hedgehog; ce qui aux yeux des auteurs permet à Smo d'accéder au titre de RCPG canonique. Smo activé par son ligand, comme les autres RCPG classiques, subirait un changement de conformation promouvant, dans son cas, la dissociation de la sous-unité $G\alpha_i$. Cette dernière, une fois libérée, viendrait réguler l'activité de l'adénylate cyclase, une

CHAPITRE I

enzyme catalysant la production d'AMP cyclique (AMPc). L'AMPc est un second messenger utilisé pour la transduction de signaux et qui est régulé négativement par l'activation de la protéine $G\alpha_i$ (Ogden et al., 2008).

3.3.4. Costal-2

Costal-2 (Cos2) est une kinésine atypique (Sisson et al., 1997), servant de protéine d'échafaudage pour un complexe cytoplasmique transducteur du signal Shh en aval de Smo. Ce complexe est composé de Cos2 lui-même, Fused (Fu), Cubitus interruptus (Ci), (qui est l'homologue de drosophile des facteurs Gli mammifères) et parfois Suppressor-of-Fused (SuFu), dépendant du contexte cellulaire (Lum et al., 2003b; Stegman et al., 2000). Ce complexe interagit fortement avec les microtubules de façon Hh-dépendante, probablement via le domaine moteur de Cos2 (Ishii, 2005), ce qui est conséquent avec sa similitude avec les kinésines. Cos2 interagit également avec la queue cytoplasmique de Smo, dans un contexte où la voie Shh est activée (Jia et al., 2003; Ogden et al., 2003). De plus, Cos-2 interagit avec les kinases PKA, CKI et GSK3 qui seront abordées plus loin (Zhang et al., 2005).

Bien qu'on parle généralement de Cos2 à la fois dans les voies Hh et Shh, il faut en fait préciser que chez les vertébrés, Cos2 correspond plutôt à certains membres de la superfamille des kinésines KIF, spécialement KIF27 et KIF7 (Katoh and Katoh, 2004; Miki et al., 2001). L'implication des homologues de vertébrés dans la voie Hh semble évolutivement conservée (Tay et al., 2005).

3.3.5. Fused

Le gène *fused* fut révélé comme interagissant génétiquement avec les gènes *costal-2* et *suppressor of fused* grâce à des études chez la drosophile. Il s'avéra que ce gène code pour la kinase sérine/thréonine Fused (Fu) (Preat et al., 1990), qui a pour substrat la protéine Cos2 (Nybakken et al., 2002; Ruel et al., 2007). Fused ne démontre pas d'homologies avec d'autres kinases connues (autre concernant le domaine kinase) (Preat et al., 1993). Chez la drosophile, Fu est une composante à part entière de la voie Hh, étant requise pour la transduction du signal. Il faut toutefois préciser qu'il semblerait que le rôle de Fu ne soit pas conservé chez les vertébrés, puisque la souris *knock-out* pour l'homologue de Fu se développe normalement lors de l'embryogenèse. Cette absence de phénotype pourrait être

CHAPITRE I

due à une redondance fonctionnelle ou à une plus grande complexité de la voie Hh chez les vertébrés (Chen et al., 2005; Merchant et al., 2005).

3.3.6. Suppressor of Fused

Le gène *suppressor of fused* a été identifié, comme son nom l'indique, en tant que suppresseur du phénotype *fused* observé chez la drosophile (Preat, 1992). La protéine encodée, Suppressor of Fused (SuFu), a semblé bien mystérieuse en premier lieu, ne montrant d'homologies avec aucune protéine connue et ne portant qu'un domaine PEST (Pham et al., 1995) ; ces séquences, riches en résidus proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), sont associées à des protéines avec un taux rapide de dégradation (Rogers et al., 1986). Un lien avec Gli1 s'établit ensuite, lorsqu'il fut démontré que SuFu interagit avec Gli1 et Gli3 (Dunaeva et al., 2003; Pearse et al., 1999) et qu'en fait, SuFu contrôle la distribution sous-cellulaire de Gli1 (Ding et al., 1999) pour moduler son activité comme facteur de transcription (Kogerman et al., 1999). Ce rôle de répresseur de la voie serait conservé évolutivement puisqu'en absence du gène de SuFu, il y a présence de défauts développementaux majeurs, associés à une signalisation Hh suractivée (Svard et al., 2006).

3.3.7. Cubitus interruptus et les facteurs Gli

La protéine de drosophile *Cubitus interruptus* (Ci) est un facteur de transcription de type doigt de zinc, possédant 3 homologues chez les vertébrés, soient Gli1, Gli2 et Gli3 (Ruiz-Gomez et al., 2007; Ruppert et al., 1990). Ci est responsable de l'activation transcriptionnelle des gènes induits sous l'action de Hh (Alexandre et al., 1996; Von Ohlen et al., 1997). Chez les mammifères, les facteurs Gli modulent la transcription responsable de divers effets biologiques, dont notamment la détermination du destin ventral des neurones du tube neural (Lee et al., 1997).

3.4. Molécules modulant la voie canonique (non-exclusives à la voie Shh)

Certaines autres molécules sont plutôt considérées comme des modulateurs des composantes centrales de la voie Hh/Shh canonique. Bien que ces protéines soient impliquées dans la transduction du signal, leur fonctionnement n'est pas exclusivement dédié à la voie Hh (Lum and Beachy, 2004).

CHAPITRE I

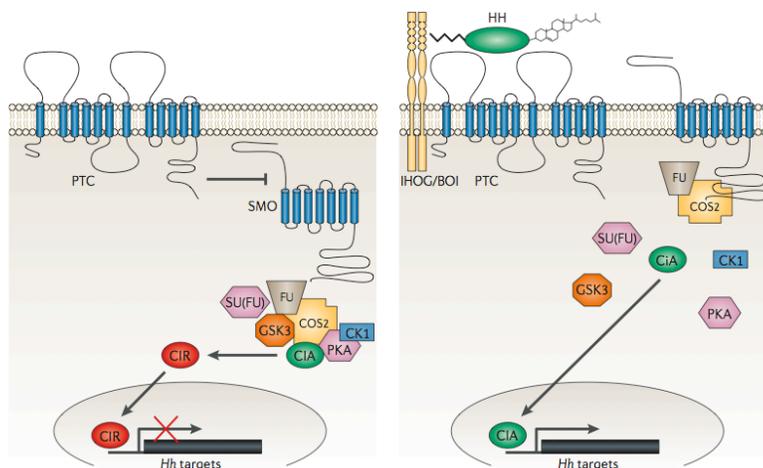


Figure 5. Schéma plus détaillé illustrant la transduction de la voie Sonic hedgehog (Shh) canonique. (À gauche) En absence de Shh, Ptc exerce une inhibition sur la protéine sur Smo via un mécanisme encore mal caractérisé. Lorsque la voie est inactive, il y a présence d'un complexe cytoplasmique incluant Ci. Ci activé (Ci₁₅₅ ou CiA) est retenu au cytoplasme par ce complexe, contenant les kinases GSK3 et CKI. Ces kinases phosphorylent Ci et médient ainsi sa dégradation en Ci répresseur (Ci₇₅ ou CiR). Les effets transcriptionnels de Ci sont donc inhibés lorsque la voie est inactive. (À droite) Quand Hh vient lier Ptc, il y a levée de l'inhibition sur Smo. Il y a alors phosphorylation de la queue cytoplasmique de Smo par CKI et PKA. L'activation de Smo engendre un recrutement de Cos2 et une dislocation du complexe cytoplasmique. Ci₁₅₅ (ou CiA) échappe ainsi à la phosphorylation et à la dégradation et peut transloquer au noyau pour activer la transcription des gènes cibles. (Schéma tiré d'une revue de Ingham et Placzek parue en 2006 (Ingham and Placzek, 2006))

3.4.1. Protéine Kinase A

La protéine kinase A (PKA) a une activité AMPc-dépendante et fait donc partie de la famille des kinases activées par les seconds messagers. PKA est une sérine/thréonine-kinase capable de phosphoryler différents substrats, comprenant typiquement la queue cytoplasmique des RCPG, souvent indépendamment de la présence du ligand sur le récepteur. PKA est cependant activée lorsque le RCPG est stimulé par son ligand, via la production d'AMPc. Une fois activée, PKA peut phosphoryler à son tour un de ses substrats, GRK2, pour activer celui-ci (voir section 3.4.4) (Cong et al., 2001).

La PKA s'est avéré être un fort régulateur négatif de la voie Shh. Chez les vertébrés, PKA phosphoryle Gli2, promouvant sa dégradation via le protéasome, suggéré comme étant un des mode de répression de la voie en absence de Shh. Le signal Shh viendrait inhiber cette phosphorylation et permettre l'accumulation de Gli2 (Pan et al., 2006; Pan et al., 2009).

CHAPITRE I

Toutefois, PKA semble avoir un double rôle chez la drosophile : en plus de promouvoir la dégradation de Ci (Price and Kalderon, 1999), PKA est un régulateur positif. En effet, PKA contribue à phosphoryler Smo et à l'envoyer à la membrane, participant donc à l'activation de la voie en présence de Hh (Jia et al., 2004). Il faut toutefois préciser que les sites de phosphorylation de la queue cytoplasmique de Smo ne sont pas conservés, ce qui pourrait expliquer cette divergence (Riobo and Manning, 2007).

3.4.2. « Casein Kinase I » (CKI)

La « Casein Kinase I » (CKI ou CK1) est une famille de sérine/thréonine-kinases qui fut parmi les premières à être caractérisées. Certains membres des CKI montrent une certaine activité tyrosine-kinase, mais dans des contextes biologiques bien pointus. Il s'agit en fait d'une famille de kinases régulées à différents niveaux, pouvant phosphoryler une panoplie de protéines fort différentes (entre autres, des facteurs de transcription, protéines du cytosquelette, récepteurs et enzymes) (Knippschild et al., 2005).

Chez la drosophile, CKI fut établi comme un facteur phosphorylant Ci, mais seulement une fois qu'il ait d'abord été phosphorylé par PKA. Cette phosphorylation survient en absence de Hh et garde la voie inactive (Price and Kalderon, 2002). De plus, un crible à la recherche de composantes de la voie Hh identifia CKI, ce qui vint confirmer son rôle au sein de la voie (Lum et al., 2003a). D'autres travaux démontrèrent ensuite que CKI serait responsable de l'hyperphosphorylation de la queue cytoplasmique de Smo en présence de Hh (Apionishev et al., 2005; Jia et al., 2004; Zhou et al., 2006).

3.4.3. « Glycogen Synthase Kinase 3 » (GSK3)

Chez les vertébrés, la « Glycogene Synthase Kinase 3 » (GSK3) est une famille de sérine/thréonine-kinases, comprenant GSK3 α et GSK3 β , exprimée de façon ubiquitaire (mais montrant un enrichissement dans le cerveau) (Woodgett, 1990). GSK3 est conservée évolutivement et correspond au gène shaggy/zeste-white3 chez la drosophile. Comme son nom l'indique, GSK3 fut tout d'abord associée à un rôle de kinase pour la glycogène synthase, l'enzyme catalysant la production de glycogène. Un rôle pour GSK3/Shaggy fut ensuite trouvé au sein de la voie Wnt, puis de la voie MAPK (Shaw and Cohen, 1999) et Hh (Jia et al., 2002). Les signaux activateurs de ces voies (entre autres, l'insuline, certains facteurs de croissance, Hh) ont typiquement un effet antagoniste de GSK3 activé. L'efficacité de GSK3 comme kinase est classiquement influencée par la « pré-

CHAPITRE I

phosphorylation » du substrat : le site de phosphorylation sera optimal pour GSK3 s'il y a présence d'un résidu phosphorylé situé 4 résidus plus loin (Frame and Cohen, 2001).

Un des substrats de Shaggy est le facteur de transcription Ci, si ce dernier est pré-phosphorylé par PKA. L'hyperphosphorylation de Ci mène à sa dégradation. Il s'agirait d'un mode de répression de la voie Hh en absence du ligand (Jia et al., 2002), combiné à l'action de CKI qui agit de façon similaire (Price and Kalderon, 2002; Zhang et al., 2005).

3.4.4. « G-protein-coupled receptor kinase 2 » (GRK2)

Les protéines « G-protein-coupled receptor kinases » (GRK) sont des serine/thréonine-kinases capables de phosphoryler les RCPG lorsqu'ils sont en conformation active (c'est-à-dire ayant été activés par leur ligand spécifique). Cette famille de kinases est composée de 6 membres (GRK1-6), qui sont exprimés de façon ubiquitaire, à l'exception de GRK1 et GRK4 qui ont un patron d'expression plus restreint. Il faut aussi noter que GRK1 et GRK2 sont retrouvés de la drosophile aux vertébrés, ces deux protéines étant toutefois les plus divergente entre elles au sein de la famille GRK (Penela et al., 2003; Pitcher et al., 1998).

GRK2 fut mis en évidence dans différents types cellulaires mammifères comme étant requis pour propager le signal Shh une fois Smo activé et ce, au sein de différents types cellulaires incluant des cellules du SNC (Atkinson et al., 2009). En présence de Shh, GRK2 servirait à phosphoryler la queue cytoplasmique de Smo ainsi qu'à recruter la β -arrestin2 jusqu'à Smo (Chen et al., 2004b; Meloni et al., 2006).

3.4.5. β -arrestine 2

Les β -arrestines sont des adaptateurs capables d'interagir avec les RCPG, une fois ces derniers liés et phosphorylés par les GRK. Cette interaction empêche la liaison du RCPG activé avec « sa » protéine G, médiant ainsi la désensibilisation des RCPG. Les β -arrestines sont aussi impliquées dans l'internalisation des RCPG grâce à leur capacité de lier les protéines de la machinerie endocytaire. De plus, les β -arrestines agissent comme transducteurs de signaux cellulaires, en recrutant entre autres les kinases de la famille Src (SFK) (Luttrell et al., 1999; Miller et al., 2000) et certaines composantes de la voie ERK/MAPK vers les RCPG activés (Tohgo et al., 2002). Les β -arrestines, c'est-à-dire β -arrestine 1 et β -arrestine 2, sont exprimées de façon ubiquitaire; mais démontrent un enrichissement particulier dans les tissus neuronaux et la rate (Attramadal et al., 1992; Luttrell and Lefkowitz, 2002).

CHAPITRE I

Dans les cellules mammifères, il fut démontré que la β -arrestin 2 interagit avec Smo activé en présence de Shh, permettant ainsi l'endocytose de Smo. GRK2 et la β -arrestine 2 synergisent avec Smo activé pour transduire le signal Shh jusqu'aux facteurs de transcription Gli (Chen et al., 2004b; Meloni et al., 2006). De façon intéressante, l'endocytose de Smo semble relié à une activation de la voie chez les mammifères, tandis qu'il s'agit plutôt d'un mode d'inactivation de la voie chez la drosophile (Denef et al., 2000; Martin et al., 2001).

3.4.6. Rab23

Les petites GTPases de la famille Rab comprend plusieurs membres (environ 60), dont certains sont impliqués dans le contrôle du transport vésiculaire. Par exemple, certaines Rab sont importantes pour contrôler l'internalisation des récepteurs activés par leur ligand, en régulant le cytosquelette d'actine (Lanzetti et al., 2000).

Dans le cas de Rab23, il fut tout d'abord démontré qu'il s'agit d'un régulateur négatif de la voie Shh (Eggenchwiler et al., 2001). Ensuite, il s'avéra que Rab23 régule la localisation sous-cellulaire des composantes de la voie Shh, entre Smo et les facteurs Gli. Il semblerait toutefois que ce mode de régulation de la voie Shh soit spécifique aux vertébrés (Eggenchwiler et al., 2006).

3.5. Transduction cellulaire par la voie canonique

3.5.1. La liaison de Shh à Patched induit l'activation de Smoothened

À l'état basal, Ptc inhibe l'activité intrinsèque de Smo de signaler. Le mode de répression de Ptc sur Smo reste encore nébuleux. Bien que certaines expériences biochimiques suggèrent l'existence d'un complexe Ptc-Smo (Stone et al., 1996; Walthall et al., 2007), il est également proposé que Ptc inhibe Smo de façon indirecte (Ingham et al., 2000; Taipale et al., 2002), conséquemment avec certaines observations démontrant que ces deux protéines membranaires ne co-localisent pas au niveau sous-cellulaire (Denef et al., 2000).

Une idée intéressante réside dans la structure de Ptc et Smo. Ptc ressemble beaucoup à certains transporteurs bactériens (comme décrit précédemment) et voit son activité perturbée lorsque sont mutés des résidus conservés et requis pour le fonctionnement normal chez ces autres transporteurs (Taipale et al., 2002). Quant à Smo, cette protéine possède une structure de RCPG, caractérisés pour leur capacité à être activés en présence de leur ligand

CHAPITRE I

spécifique (Miller, 2008). La vitamine D3 fut proposée pour inhiber Smo (en absence de Shh) (Bijlsma et al., 2006) ; tandis que d'autres molécules ont été mis en évidence pour activer Smo, telles que les oxystérols (Corcoran and Scott, 2006; Dwyer et al., 2007) et les lipoprotéines (Callejo et al., 2008). Les oxystérols et la vitamine D dérivent du cholestérol. Les lipoprotéines sont quant à elles des structures contenant à la fois des protéines et des lipides ; il s'agit sommairement d'une micelle, constituée d'une monocouche de phospholipides entourant des particules de triglycérides et de cholestérols, servant à transporter certaines molécules insolubles dans le sang (Schroepfer, 2000). Pris ensemble, il est permis de croire que Ptc exporte une molécule, par exemple la vitamine D3, hors de la cellule ce qui garderait Smo inhibé. Shh, en se liant à Ptc, agirait donc en inhibant la sécrétion de la vitamine D3, ce qui lèverait l'inhibition sur Smo (Bijlsma et al., 2006).

3.5.2. Transduction du signal, de Smoothened à Ci/Gli

En absence de signal Hh

En aval de Smo, la voie basale est gardée en mode inactif en partie grâce à la protéine d'échafaudage Cos-2. Cos-2 séquestre le facteur de transcription Ci et les kinases Fu, GSK3, CKI et PKA. Ces trois dernières kinases sont responsables de la phosphorylation de Ci, entraînant sa dégradation en un produit de clivage inactif.

En présence de signal Hh

Bien qu'il ne soit pas clair comment se propage le signal de Ptc jusqu'à Smo, on sait toutefois que Smo subit un changement conformationnel en présence de Hh (Zhao et al., 2007). Il y a alors phosphorylation de Smo par PKA, puis par CKI (Apionishev et al., 2005; Zhang et al., 2004).

Sous l'action de Hh, il y également activation de Fu (Therond et al., 1996), qui phosphoryle alors Cos-2. Cette phosphorylation induit la fragmentation du complexe échafaudé par Cos-2 (Ruel et al., 2007), comprenant Fu et Ci en plus des kinases phosphorylant Ci (PKA, GSK3, CKI) (Zhang et al., 2005). Le complexe résiduel, composé de Cos-2 et Fu, est recruté à Smo activé ; l'interaction entre Smo et Cos-2 est requise pour la transduction du signal Hh (Jia et al., 2003; Lum et al., 2003b).

La déséquestration de Ci permet à celui-ci de ne plus subir la phosphorylation qui entraînait sa dégradation (Zhang et al., 2005) ; Ci peut alors être transloqué au noyau.

CHAPITRE I

3.5.3. Transcription des gènes cibles via l'activation de Ci/Gli

Le facteur de transcription Ci est trouvé sous deux formes : la forme pleine longueur, Ci₁₅₅ (qui active la transcription) et la forme dégradée, Ci₇₅ (qui n'active pas la transcription). La dégradation de Ci₁₅₅ en Ci₇₅ est médiée par la E3 ubiquitine ligase Slimb, qui reconnaît la forme Ci₁₅₅ phosphorylée (Smelkinson and Kalderon, 2006). De plus, Ci₁₅₅ est séquestrée au cytoplasme par Cos-2 et potentiellement par SuFu (Methot and Basler, 2000), en absence de Hh. La forme Ci₇₅, même si elle est clivée, est capable d'aller au noyau et de lier l'ADN. En fait, Ci₇₅ est non seulement inactive, mais répressive pour la transcription (Aza-Blanc and Kornberg, 1999). Chez les vertébrés, il fut montré que Gli-1 peut recruter des co-répresseurs de la transcription via SuFu (Cheng and Bishop, 2002).

En présence du signal Hh, il y aura régulation de SuFu (potentiellement par Fu), qui permettrait alors à Ci/Gli de transloquer au noyau (Cheng and Bishop, 2002) (additionné aux événements de signalisation précédemment décrits). Il peut alors y avoir transcription par Ci/Gli et expression des gènes cibles induit par l'activation de la voie Hh, requis par exemple pour les événements de différenciation cellulaire (Lum and Beachy, 2004).

3.6. Molécules plus récemment impliquées dans la voie Shh canonique

De nouveaux facteurs ont été identifiés comme ayant un effet sur la voie transcriptionnelle induite par Shh. Leur place dans la voie canonique reste toutefois à être précisée et leurs rôles potentiels dans divers processus cellulaires induits par Shh doivent encore être mieux caractérisés.

3.6.1. « Missing In Metastasis » (MIM)

« Missing in Metastasis » (MIM), aussi appelée « Basal cell carcinoma-enriched gene 4 » (Beg4) », est une molécule intracellulaire avec une séquence multidomaines, indiquant un rôle potentiel de protéine d'échafaudage. MIM est exprimée fortement dans les neurones et les muscles en développement. MIM fut identifiée comme une composante affectant la voie Shh lors d'un crible visant à identifier les gènes cibles de Shh, encodant potentiellement pour des protéines enrichies dans les carcinomes des cellules basales (Gonzalez-Quevedo et al., 2005). Non seulement le gène pour MIM répond à Shh, mais la protéine encodée potentialise la transcription par les facteurs Gli, probablement via la formation d'un complexe avec SuFu et les Gli (Callahan et al., 2004). De plus, MIM montre la particularité

CHAPITRE I

de pouvoir interagir avec l'actine monomérique et les filaments d'actine (voir section 5.1.3.), via un domaine « Wasp-homology 2 » (WH2) et un domaine « IRSp53 MIM domain » (IMD), respectivement. Le domaine IMD seul est capable de promouvoir la formation de faisceaux d'actine et de filopodes *in vitro* (Yamagishi et al., 2004). MIM peut lier et activer, indirectement, Rac1 via ce domaine, mais il semblerait que cette interaction vienne inhiber la capacité du domaine IMD à générer des faisceaux d'actine (Bompard et al., 2005). Sa surexpression *in vitro* mène à une structure d'actine anormale (Mattila et al., 2003), engendrée par son action sur les filaments d'actine combinée à un rôle d'induction de la courbure de la membrane plasmique (réminiscent de protéines à domaine BAR) (Lee et al., 2007; Mattila et al., 2007).

Finalement, MIM peut interagir avec la protéine tyrosine phosphatase δ (PTP δ ou RPTP δ), un récepteur de type I avec une région extracellulaire comprenant des domaines fibronectine III et immunoglobuline (Pulido et al., 1995). Cette molécule régule l'adhésion à la matrice extracellulaire et les contacts cellule-cellule (Machesky and Johnston, 2007; Woodings et al., 2003).

3.6.2. Récepteurs à Shh

3.6.2.1. Hip

Le récepteur « Hedgehog Interacting Protein » (Hip) fut identifié comme une glycoprotéine capable de lier Shh, mais ne possédant pas de domaine cytosolique. Sa capacité de lier Shh, sans engendrer de signalisation qui lui est propre, aurait pour rôle d'atténuer la signalisation par Shh (Chuang and McMahon, 1999; Zeng et al., 2001).

3.6.2.2. Les glypicanes

Les glypicanes sont une famille de protéoglycanes à héparane sulfate comprenant six membres chez les vertébrés (glypicane-1 à -6) et deux homologues chez la drosophile. Les deux glypicanes de drosophile sont nommés « Division abnormally delayed » (Dally) et « Dally-like protein » (Dlp). Les glypicanes sont en fait des protéines attachées à la membrane cellulaire via un GPI et décorées de polysaccharides d'héparane sulfate (Filmus, 2001). Dlp fut identifié comme ayant un rôle dans la voie Hh lors d'un crible à l'ARN interférent (Lum et al., 2003a) et était alors connu pour son rôle dans la voie Wnt. Il fut démontré que non seulement Dlp induit l'endocytose de Hh, mais qu'en plus, Dlp

CHAPITRE I

catalyserait une internalisation du complexe Ptc/Hh requis pour l'activation maximale de la voie (Gallet et al., 2008). Chez les vertébrés, il fut démontré que le glypican-3 est capable de lier Shh, pour ensuite médier son endocytose et sa dégradation. Il s'agirait d'un mécanisme régulant négativement la voie Shh, de par la compétition induite entre Ptc et GPC pour le ligand (Capurro et al., 2008). Le rôle divergent évolutivement des glypicanes pourrait être dû à la co-internalisation de Ptc chez la drosophile ou à une complexité plus grande de la voie Hh chez les vertébrés (Beckett et al., 2008).

Des implications pour les glypicans dans le guidage ont été notées. Le glypican-3 est capable d'activer la voie Wnt non-canonique, agissant sur la morphologie cellulaire et la migration (Stigliano et al., 2009). Également, le glypican-1 humain fut caractérisé pour lier la molécule Slit (Ronca et al., 2001). Finalement, il fut reporté que le glypican-2 (montrant une affinité envers la laminine-1) est exprimé dans l'axone et le cône de croissance des neurones en croissance, incluant les axones commissuraux embryonnaires. De façon intéressante, cette expression disparaît une fois que l'axone a rejoint sa cible (Ivins et al., 1997).

3.6.2.3. Mégaline

La mégaline, aussi connue comme la « Lipoprotein Receptor-related Protein 2 » (LRP-2), est capable de lier plusieurs ligands, dont Shh (McCarthy et al., 2002). La mégaline fut mise en évidence pour sa capacité à endocytoser Shh. Ce processus ferait appel à une phosphorylation de la queue cytoplasmique de la mégaline, médiée par GSK3 (et potentiellement PKA et CKII, selon des évidences *in vitro*) (Yuseff et al., 2007). Il fut aussi démontré que la mégaline interagit avec la « Protease Nexin 1 » (NP1) pour antagoniser le signal Shh dans les cellules granulaires du cervelet en développement (Vaillant et al., 2007).

L'expression de la mégaline au sein des neurones du tube neural embryonnaire, ainsi que le phénotype de la souris mutante (montrant des défauts développementaux reliés à la différenciation neuronale), seraient conséquents avec une implication active de cette protéine au sein de la voie Shh (McCarthy et al., 2002; Spoelgen et al., 2005).

CHAPITRE I

3.6.2.4. Gas1

La protéine « Growth arrest specific gene-1 » (Gas-1) est une protéine extracellulaire, retenue à la membrane via un GPI (Lee et al., 2001), pouvant lier Shh. Certaines études portant sur le cancer ont décrit Gas-1 en tant qu'inhibiteur du cycle cellulaire (donc un régulateur négatif de la prolifération cellulaire) et un suppresseur de tumeurs via son action régulatrice de l'apoptose. Cependant, lors d'études portant sur l'embryogenèse, Gas-1 s'est avéré surtout avoir un rôle associé à une régulation positive de la prolifération cellulaire *in vivo*. Par exemple, Gas-1 est requis pour la prolifération des précurseurs des cellules granulaires du cervelet, qui est induite par la production de Shh par les cellules de Purkinje (Liu et al., 2001; Wallace, 1999). Quant au rôle de Gas-1 par rapport à Shh, il fut déterminé qu'il était un régulateur positif de la voie de signalisation (promouvant les événements de différenciation), tout particulièrement dans les régions où il y a peu de ligand. Il fut proposé que Gas-1 pourrait servir à lier Shh pour ensuite le présenter à Ptc, et ainsi faciliter l'initiation de la transduction. L'expression de Gas-1 est négativement régulée par la présence de Shh, conséquemment avec la fonction de Shh dans des domaines où très peu de Shh est détectable (Martinelli and Fan, 2007a). Il fut également reporté que Gas-1 et le récepteur Cdo coopèrent fortement pour favoriser le signal Shh lors du développement du tube neural (Allen et al., 2007; Martinelli and Fan, 2007b).

3.6.2.5. Cdo

La protéine « Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes » (Cdo) est un récepteur de Shh (Okada et al., 2006; Tenzen et al., 2006). Sa structure comprend une queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire et une portion extracellulaire, incluant quatre domaines immunoglobuline (Ig) et trois domaines fibronectine de type III (Kang et al., 1997). Ce type de structure rappelle celles retrouvées chez d'autres récepteurs de molécules de guidage, tels que les protéines DCC et Robo (liant respectivement les facteurs Nétrine et Slit) (Okada et al., 2006). Cdo possède un homologue chez la drosophile appelé « Interference hedgehog » (Ihog), qui possède aussi la capacité d'interagir avec Hh (McLellan et al., 2006; Yao et al., 2006).

Chez les mammifères, Cdo est largement exprimé lors de l'embryogenèse, avec une expression accrue au niveau de l'appareil moteur et du système nerveux. L'expression de Cdo chevauche largement celle de Boc (voir section suivante), soutenant un rôle pour ces

CHAPITRE I

facteurs dans une panoplie d'événements lors de l'embryogenèse (Mulieri et al., 2002; Mulieri et al., 2000). Cdo fut d'abord identifié comme un régulateur positif du développement des cellules musculaires (Cole et al., 2004; Kang et al., 1998), la surexpression de Cdo ou Boc pouvant engendrer la différenciation *in vitro* (Wegorzewska et al., 2003). Ce rôle pour Cdo et Boc proviendrait en partie du fait qu'ils peuvent se lier l'un à l'autre, induisant des complexes capables de signaler pour induire la différenciation myogénique (Kang et al., 2003; Kang et al., 2002). Encore dans le cadre de l'étude de la différenciation des myoblastes, une signalisation en aval de Cdo fut récemment détaillée. Il fut démontré que la queue cytoplasmique de Cdo interagit avec JLP, qui est une protéine d'échafaudage pour des composantes de la voie p38MAPK. Cdo interagit aussi avec Bnip-2 (un régulateur négatif de Cdc42) ainsi qu'avec Cdc42-GAP. L'interaction entre Cdo et Bnip-2 induit l'activation de Cdc42, entraînant ensuite l'activité de la MAPK p38 qui médie la différenciation des myoblastes (Kang et al., 2008; Takaesu et al., 2006). Ce mécanisme via JLP et Bnip-2 serait aussi utilisé pour induire la différenciation neuronale (Oh et al., 2009).

Cdo serait en effet aussi associé à la différenciation neuronale au sein du tube neural, en accord avec son implication dans la voie Shh (Tenzen et al., 2006). D'ailleurs, il fut aussi observé que Cdo régule positivement l'activation de la voie Shh canonique. Toutefois, les domaines requis pour les effets pro-myogéniques de Cdo ne sont pas impliqués pour activer la signalisation via Shh, impliquant au moins deux modes d'activation de la signalisation via Cdo (Zhang et al., 2006a). Chez la drosophile, Ihog agirait aussi positivement sur la voie Hh, en amont ou au niveau de Ptc, agissant potentiellement en synergie avec Ptc pour lier Hh à la cellule (Yao et al., 2006). Les souris mutantes pour Cdo montrent des microformes d'holoprocéphalie (HPE), phénotype qui peut être connecté à celui des souris mutantes pour Shh, qui montrent des formes franches d'HPE (Cole and Krauss, 2003; Roessler et al., 1996). Il y a également présence de défauts supplémentaires du cerveau, incluant de l'hydrocéphalie et une réduction corticale, qui seraient dus à une réduction de la prolifération des progéniteurs neuronaux (Zhang et al., 2006b).

3.6.2.6. Boc

Le récepteur à Shh « Brother of Cdo » (Boc) est une protéine similaire à Cdo, possédant une structure semblable : un domaine cytoplasmique, un passage transmembranaire et une

CHAPITRE I

portion extracellulaire cellulaire composée de cinq domaine Ig et trois domaines FNIII (Okada et al., 2006). Tout comme Cdo, sa structure lui conférant une similitude avec d'autres récepteurs impliqués dans le guidage axonal. Cdo et Boc arborent une impressionnante homologie de leur domaine extracellulaire, mais possèdent des domaines cytoplasmiques différents (Yao et al., 2006). Étant donné que l'expression de Boc et Cdo est très semblable (Mulieri et al., 2002; Mulieri et al., 2000), il était attendu qu'ils puissent réguler conjointement certains processus lors du développement. Leur rôle conjoint comme régulateurs favorisant la différenciation des myoblastes fut ensuite démontré (Kang et al., 2003; Kang et al., 2002). Puis vinrent les premières évidences d'un rôle pour Boc dans les neurones ; il fut reporté que Boc est un facteur médiant le guidage axonal dans le système nerveux en développement (Connor et al., 2005). Puis, presque simultanément, Boc fut associé à un rôle dans la détermination des neurones du tube neural (Tenzen et al., 2006) et à un rôle dans le guidage axonal des neurones commissuraux (Okada et al., 2006).

4. GUIDAGE AXONAL

4.1. Notion de guidage axonal

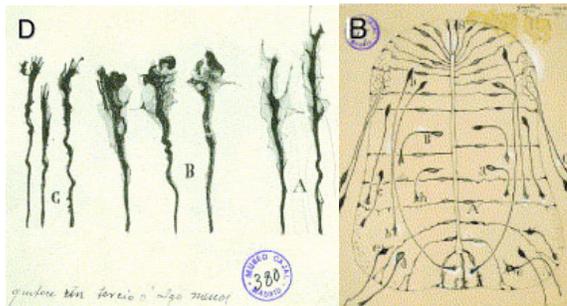


Figure 6. Les cônes de croissance, ainsi que les neurones commissuraux ont été caractérisés par Ramon y Cajal. Dessins effectués Ramón y Cajal résumant des compilations d'observations faites sur des coupes d'embryons de poulet (après coloration de Golgi), publiées dans « Histologie du système nerveux de l'Homme et des vertébrés » en 1909-1911. À gauche : les cônes de croissance évoquent des structures dynamiques, étant toujours différentes les unes des autres. À droite : observations des divers prolongements axonaux présents dans le tube neural en développement. On peut y voir, entre autres, une représentation des axones des neurones commissuraux se dirigeant vers la plaque basale.

L'axone réagit aux molécules de guidage grâce au « cône de croissance », une structure hautement dynamique située à l'extrémité de l'axone en migration. Lors de la migration axonale, le cône de croissance balaie l'environnement à la recherche de signaux de guidage. Lorsqu'un signal est détecté, le cône de croissance se remodèle pour diriger l'axone vers la source chimioattractante ou à l'opposé de la source chimioréulsive. L'idée que la fonction du cône de croissance soit de scruter son environnement fut proposée par Cajal en 1909, alors que furent décrits les cônes de

croissance lors de l'avènement de l'histologie en neurosciences (voir figure 6, à gauche) (de

CHAPITRE I

Castro et al., 2007). Bien que l'idée impliquant des facteurs présents en différents points de la trajectoire de l'axone a été proposée tôt, l'identification de facteurs chimiotactiques se fit attendre. Le système modèle associé à la découverte de la première molécule de guidage résidait dans l'étude des trajectoires des neurones commissuraux du tube neural en développement.

4.2. Les neurones commissuraux utilisés comme modèle pour l'étude du guidage axonal

L'étude des projections des neurones commissuraux de la moelle épinière chez les vertébrés est un système connu depuis longtemps, les trajectoires axonales normales ayant été caractérisées depuis leurs premières descriptions au début du siècle passé (voir figure 6, à droite) (de Castro et al., 2007).

4.2.1. Les neurones commissuraux comme système modèle

Les neurones commissuraux (ayant leur corps cellulaire logé dans la partie dorsale du tube neural) projettent leur axone vers le côté ventral de l'animal. Les axones croisent ensuite la ligne médiane au niveau de la plaque basale (créant ainsi une commissure) et se dirigent

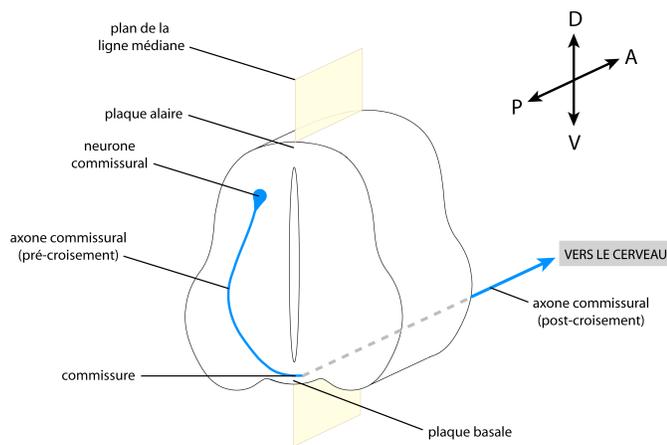


Figure 7. Schéma représentant la migration de l'axone d'un neurone commissural lors de l'embryogenèse. Le corps cellulaire du neurone commissural est logé dans la partie dorsale du tube neural en développement. Les axones commissuraux migrent vers la plaque basale (située du côté ventral), la croisent (commissure), puis s'éloignent de celle-ci pour se diriger vers la partie antérieure de l'embryon (vers le cerveau). Les axes de l'embryon sont représentés par les flèches situées dans le coin supérieur droit (« D » pour dorsal, « V » pour ventral, « P » pour postérieur et « A » pour antérieur)

ensuite vers le côté antérieur de l'embryon (voir figure 7). Lors d'un tel processus, l'axone doit : (1) être attiré vers la zone de commissure avant de croiser, (2) perdre cette capacité attractive pour sortir de la zone de commissure et (3) être ensuite repoussé de la zone de commissure afin de s'éloigner. Ces décisions prises par l'axone représentent à elles seules un potentiel énorme pour l'étude du guidage axonal ; ce type de système simple impliquant un

CHAPITRE I

concept crucial d'intégration des différents signaux présents dans l'environnement de l'axone.

4.2.2. L'identification de molécules de guidage à l'aide du système modèle des neurones commissuraux

L'existence des signaux de guidage fut tout d'abord mise en évidence, avec les premières expériences démontrant que des explants cellulaires pouvaient influencer le guidage à distance, prouvant qu'il y avait production de facteurs chimiotactiques. Des études reportèrent que le « Nerve Growth Factor » (NGF), induisait une attraction des neurones des ganglions dorsaux *in vitro* et que sa surexpression *in vivo* attirait les fibres nerveuses sympathiques (Menesini Chen et al., 1978). Le NGF fut donc la première molécule de guidage connue, bien qu'elle était identifiée depuis 1954 pour sa capacité à promouvoir la croissance des neurones (Cohen et al., 1954).

En parallèle, les tentatives d'identification de nouvelles molécules chimiotactiques furent souvent vaines et on dû attendre l'avènement des techniques biochimiques plus raffinées avant que soit découverte une molécule de guidage.

Au sein du tube neural, il avait été démontré que la plaque basale dégage un ou des facteurs capable(s) de promouvoir et de diriger la croissance des axones commissuraux» (Placzek et al., 1990a; Tessier-Lavigne et al., 1988). Au sein de deux études publiées conjointement en 1994 par le laboratoire Tessier-Lavigne, ce facteur fut isolé et caractérisé. Il s'avéra être suffisant pour induire croissance et l'attraction des axones commissuraux *in vitro* et *in vivo* (Serafini et al., 1996). La molécule fut nommée « Nétrine », d'après le mot sanskrit « netr », signifiant « celui/celle qui guide » (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994).

4.3. Molécules associées au guidage axonal des neurones commissuraux

Depuis la découverte de la Nétrine, plusieurs autres molécules de guidage furent aussi mises en évidence pour leur effet de guidage sur les neurones commissuraux. Certains induisent l'attraction des neurones commissuraux et d'autres, la répulsion. Quelques facteurs ont aussi été reportés pour avoir à la fois un effet attractif et répulsif, dépendant du contexte biologique (type cellulaire, temps dans le développement, etc.) Les axones commissuraux sont soumis à plusieurs molécules de guidage lors de leur migration. La première classe comprend 4 familles « classiques » de molécules de guidage, c'est-à-dire

CHAPITRE I

les Sémaphorines, les Slit, les Éphrines et les Nétrines (Dickson, 2002). La deuxième classe de molécules incluent des facteurs ayant clairement un rôle double lors du développement : plus précisément un rôle de guidage et un rôle de morphogène. Cette deuxième catégorie comprend les morphogènes Wnt, BMP et Shh (Charron and Tessier-Lavigne, 2005).

Il a été démontré que certains des récepteurs abordés ici sont phosphorylés en tyrosine une fois liés à leur ligand spécifique (voir DCC et UNC5 à la section 4.3.4) (Meriane et al., 2004; Tong et al., 2001), ainsi que EphA et EphB à la section 4.3.3) (Palmer et al., 2002; Zisch et al., 1998)). Cette modification post-transcriptionnelle semble globalement importante pour le guidage axonal, puisqu'une perte de l'activité de phosphorylation en tyrosine engendre des problèmes d'extension des axones (Robles et al., 2005; Worley and Holt, 1996). Ces phosphorylations en tyrosine semblent hautement reliées aux kinases de la famille Src (SFK) (Knoll and Drescher, 2004; Li et al., 2004; Meriane et al., 2004) et seront davantage élaborées plus loin (voir section 6.1.1).

4.3.1. Guidage axonal médié par les Sémaphorines

Les Sémaphorines sont une famille nombreuse de ligands liés à la membrane et secrétées, séparée en 8 classes majeures : Sémaphorines-1 à -7 et Sémaphorines-V. La classe 5 est retrouvée à la fois chez les vertébrés et les invertébrés, tandis que les classe 1-2 sont uniquement retrouvées chez les invertébrés, la classe V chez les virus et les classes 3,4,6,7 chez les vertébrés (Raper, 2000). Elles ont tout d'abord été reportées pour leur rôle dans la répulsion axonale et furent donc initialement nommées « Collapsine », étant capable d'induire l'effondrement (ou du moins l'inhibition de la progression) du cône de croissance (Luo et al., 1993). Bien que le rôle répulsif des Sémaphorines leur est classiquement attribué, il fut ensuite déterminé que ces molécules peuvent aussi médier une chiomioattraction (Castellani et al., 2000). Il existe toute une variété de récepteurs pour les Sémaphorines, séparés en 2 groupes : les Neuropilines et les Plexines. La capacité de convertir le signal répulsif en signal attractif dépend de la co-expression de ces récepteurs avec d'autres protéines, telles que L1 (qui est une molécule d'adhésion à domaines fibronectine III et immunoglobulines) (Castellani et al., 2002).

En terme du guidage des neurones du tube neural, des travaux démontrèrent que des sémaphorines sont exprimées par les tissus ventraux et médient une répulsion des neurones

CHAPITRE I

commissuraux après que ceux-ci aient croisé la plaque basale (post-croisement), les empêchant de revenir à la ligne médiane (Zou et al., 2000).

4.3.2. Guidage axonal médié par les Slit

La protéine sécrétée Slit a tout d'abord été identifiée comme un facteur produit par certaines cellules gliales trouvées de long de la ligne médiane du SNC embryonnaire de drosophile. Il fut observé par le même groupe qu'une disruption de *Slit* entraîne un problème de trajectoire des axones commissuraux (Rothberg et al., 1990). De façon indépendante, le gène *roundabout (robo)* fut identifié, lors d'un crible réalisé chez la drosophile, comme étant requis pour la migration adéquate des axones commissuraux (Seeger et al., 1993). Une altération de Robo engendre des axones commissuraux recroisant la ligne médiane de l'embryon, après l'avoir déjà croisée (Kidd et al., 1998). Ce n'est que par la suite que les preuves d'un lien ligand-récepteur entre Slit et Robo furent établies à l'aide de systèmes mammifères (Brose et al., 1999) et de drosophile (Kidd et al., 1999). Il fut plus clairement caractérisé qu'une activation de la signalisation via le récepteur Robo engendre une répulsion de l'axone, qui évite ainsi la source de Slit.

Il faut noter qu'il n'existe qu'une seule protéine Slit chez les invertébrés, tandis que trois Slits (Slit1-Slit3) sont trouvées chez les vertébrés. Concernant les récepteurs Robo, les vertébrés en possèdent quatre (Robo1-Robo4), alors que seulement trois sont retrouvés chez la drosophile (Robo1-Robo3) (Dickson and Gilestro, 2006).

4.3.3. Guidage axonal médié par les Éphrines

Dans les années 60, Sperry énonça une théorie stipulant qu'il existe dans les tissus des gradients de molécules formant globalement une carte topographique. Il élaborait cette théorie en étudiant les neurones rétiniens, qui se connectent au tectum optique (dans le cerveau) d'une manière gradée selon leur position initiale au sein de la rétine (Sperry, 1963; Tessier-Lavigne, 1995). La classe de molécules responsables de cet effet n'ont été identifiées qu'en 1995 et furent nommées « Éphrines » (Cheng et al., 1995), référant au fait que ces molécules ont pour récepteurs les protéines « Eph ». Les Eph sont des récepteurs de type tyrosine-kinase identifiés lors d'un crible fait dans une lignée de carcinome « erythropoietin-producing hepatocellular » ; le gène identifié fut ainsi baptisé « Eph » (Hirai et al., 1987; Murai and Pasquale, 2003). Les Éphrines sont des molécules de guidage attachées à la membrane de la cellule productrice : les Éphrines A sont attachées à la

CHAPITRE I

membrane via un GPI (glycosyl phosphatidylinositol) tandis que les Éphrines B ont un domaine transmembranaire. Les Éphrines se lient typiquement aux récepteurs EphA et les Éphrines B aux EphB. Les Eph et Éphrines ont été identifiées dans une panoplie de vertébrés, chez la drosophile et le nématode ; le nombre de ces gènes étant cependant plus grand chez les vertébrés (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998).

La signalisation des Éphrines, induite par contact avec leur récepteur Eph, engendre une répulsion de l'axone. Dans un territoire où il y a présence d'un gradient d'Éphrines, l'axone pourra pénétrer plus ou moins loin selon ses niveaux d'expression de récepteurs Eph. Les Éphrines et les Eph sont aussi requis pour le guidage adéquat de divers systèmes nécessitant le croisement de l'axe médiant (Williams et al., 2003; Yokoyama et al., 2001). Récemment, l'ÉphrineB3 et les récepteurs EphB ont été mis en évidence pour un rôle dans le guidage post-croisement des neurones commissuraux du tube neural (Kadison et al., 2006).

4.3.4. Guidage axonal médié par les Nétrines

Cette famille de récepteurs comprend classiquement 3 membres : Nétrine-1-3. D'autres protéines reliées aux Nétrines furent identifiées chez les vertébrés : Nétrine- β (ou Nétrine-4) (Yin et al., 2000) et les Nétrines-G (Nakashiba et al., 2000). Les Nétrines1-4 sont conservées évolutivement et correspondent à des protéines sécrétées, tandis que les Nétrines-G sont liées à la membrane par un GPI (Cirulli and Yebra, 2007).

La Nétrine-1 est la plus étudiée, connue comme facteur attractif des axones commissuraux avant que ceux-ci ne croisent la plaque basale. Elle fut également caractérisée comme facteur attractif pour d'autres neurones, par exemple les neurones empruntant la voie lemniscale (Kubota et al., 2004). La Nétrine-1 peut cependant aussi induire un effet répulsif, comme observé pour les neurones moteurs composant le nerf trochléaire (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995). Ce rôle double est possible grâce à l'expression différentielle des récepteurs de la Nétrine : les « Deleted in Colorectal Cancer » (DCC) et les UNC5 (Hong et al., 1999). L'expression de DCC seul est associée à un effet attractif sur les neurones. La co-expression de DCC et UNC5, ou l'expression de UNC5 seulement, mène à une répulsion de l'axone (Cirulli and Yebra, 2007).

CHAPITRE I

4.3.6. Guidage axonal médié par les BMP

Une fois que fut découvert le rôle de guidage de Nétrine-1 sur les axones commissuraux, une des questions sans réponse fut d'expliquer comment naviguent les axones lorsqu'ils sont en territoire dorsal. Il fut en effet observé qu'en absence de Nétrine-1 ou de son récepteur DCC, les axones traversent la partie dorsale sans problèmes (Serafini et al., 1996), supposant la présence d'un ou des facteur(s) de guidage supplémentaire(s) (probablement émis du côté dorsal). Ces facteurs furent identifiés : il s'agissait des « Bone Morphogenic Proteins » (BMP) (Augsburger et al., 1999), sécrété par la plaque alaire située du côté dorsal de la moelle épinière. Les BMP médient en effet une répulsion des axones commissuraux, les poussant hors du territoire dorsal jusqu'à ceux-ci captent le gradient attractif de Nétrine-1 émis du côté ventral.

Les BMP font partie de la superfamille des « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β), qui sont des cytokines impliquées dans une panoplie de fonctions biologiques. Chez la drosophile, le gène *decapentaplegic (dpp)* est l'homologue des TGF- β (Gelbart, 1989). Lors de la formation de la moelle épinière, certains membres de la famille BMP/TGF- β sont sécrétés par la plaque alaire (comme abordé précédemment) et sont requis pour la différenciation des neurones dorsaux (Lee et al., 1998). Les membres de cette famille possèdent donc un rôle double de morphogène et de protéine de guidage lors du développement du tube neural, agissant sur les neurones situés du côté dorsal (Charron and Tessier-Lavigne, 2005).

4.3.5. Guidage axonal médié par les Wnt

Le ligand Wnt peut activer différentes voies de signalisation ; celle étant la mieux caractérisée est définie comme la voie Wnt canonique, qui fait intervenir des composantes évolutivement conservées. La transduction de la voie Wnt canonique repose sur la régulation de l'accumulation cytoplasmique du facteur β -caténine. De façon basale, la β -caténine est ubiquitinée et envoyée au protéasome pour être dégradée, via l'ajout de phosphorylation induites par les kinases CKI et GSK3 (voir section 3.4.2 et 3.4.3 respectivement). Cependant, lorsque Wnt vient lier Frizzled (Fz), un récepteur à 7 domaines transmembranaires, il y a activation de la protéine Dishevelled (Dsh) qui ira inhiber la kinase GSK3. L'inactivation de GSK3 entraîne ainsi une baisse de phosphorylation de β -caténine, induisant du même coup une baisse de sa dégradation.

CHAPITRE I

L'accumulation de la β -caténine lui permet de lier les facteurs de transcription TCF et d'induire les effets transcriptionnels associés à Wnt.

Un rôle de guidage axonal a été découvert pour les Wnt chez la drosophile. Chez cet organisme, les neurones commissuraux montrent des projections qui croisent la ligne médiane de l'embryon (comme chez les vertébrés). Cependant, il existe une différence majeure entre les systèmes vertébrés et de drosophile : chez la mouche, l'axone peut croiser la ligne médiane soit du côté antérieur ou postérieur. Il y a donc deux commissures au niveau de la ligne médiane et l'axone choisit une seule de ces commissures. L'expression du récepteur *Derailed* sur les axones destinés à croiser du côté antérieur détermine le choix de commissure, puisque ceux-ci sont repoussés par le ligand Wnt émis du côté postérieur (Yoshikawa et al., 2003).

Quant aux vertébrés, le facteur Wnt4 forme un gradient antéropostérieur chez l'embryon, avec une expression de *Wnt4* de plus en plus grande en se dirigeant vers le côté antérieur. Ce gradient serait important pour attirer les neurones commissuraux post-croisement via l'action du récepteur Fz3 (Lyuksyutova et al., 2003).

Également chez les vertébrés, Wnt1 et Wnt3a sont émis par la plaque alaire du tube neural en développement (Hollyday et al., 1995) et auraient un rôle dans la spécification du destin cellulaire des neurones dorsaux. Les souris mutantes pour Wnt1 et Wnt3a montrent une baisse, voire une disparition, des types cellulaires caractéristiques au domaine ventral du tube neural (Chizhikov and Millen, 2005; Muroyama et al., 2002).

Les fonctions de guidage et de morphogène accordent un rôle double aux facteurs Wnt dans le développement, les plaçant dans la même catégorie de facteurs que les protéines BMP et Sonic hedgehog (Charron and Tessier-Lavigne, 2005).

4.3.7. Guidage axonal médié par Sonic hedgehog

Bien qu'une délétion génétique de la Nétrine-1 entraîne de sérieux défauts de guidage des axones commissuraux dans le domaine ventral du tube neural, une portion de ceux-ci arrivent à se rendre à la plaque basale, impliquant la présence d'un ou des facteurs supplémentaires (Serafini et al., 1996).

Le facteur attractif complémentaire à la Nétrine-1 fut identifié par Charron *et al.* et s'est avéré être le morphogène Sonic hedgehog (Shh) (Charron et al., 2003). Le gradient dorso-ventral de Shh émis par les cellules de la plaque basale avait été caractérisé auparavant,

CHAPITRE I

mais était jusqu'alors corrélé uniquement aux phénomènes de différenciation des neurones ventraux qui ont lieu plus tôt dans le développement.

Plus récemment, un autre gradient de Shh au sein du SNC en développement fut décrit : il serait établi longitudinalement dans l'embryon, montrant des niveaux diminuant de façon postérieure-à-antérieure. Ainsi, pour les axones commissuraux post-croisement, Shh aurait un rôle répulsif et médierait la migration de ces projections vers le cerveau de l'embryon (Bourikas et al., 2005). Le mécanisme moléculaire expliquant comment les axones commissuraux peuvent être attirés (pré-croisement), puis repoussés (post-croisement) par Shh n'a pas encore été dévoilé.

Lien entre le rôle de guidage de Shh et l'existence d'une voie non-canonique

L'activation de la transcription par les facteurs Gli, via la cascade précédemment décrite (voir section 3.5), constitue la charpente de la voie Shh canonique. Une signalisation Shh-dépendante induisant ses effets sans l'aide de la transcription par les facteurs Gli constituerait ainsi une voie *non-canonique*. La découverte d'un nouveau rôle pour Shh, dans le guidage axonal, a donc amené à spéculer sur l'existence d'une voie non-canonique. La preuve que le guidage axonal induit par Shh ne dépendait pas de l'activation des facteurs Gli devait cependant être faite.

Il a été décrit que Shh est capable d'affecter le cône de croissance de l'axone rapidement (en un temps quantifié pour être de 8 minutes), ce qui est incompatible avec une régulation via la transcription des facteurs Gli (qui s'étendrait plutôt sur plusieurs heures). Ce point a ensuite été prouvé et il fut démontré que la transcription n'est aucunement nécessaire pour le guidage des axones commissuraux induit par Shh (Yam et al., 2009 in press). Étant devant la preuve que Shh peut induire (1) ses effets morphogènes via les facteurs Gli (Hynes et al., 1997) et (2) son action chimio-attractante indépendamment de la transcription (Yam et al., 2009 in press), l'existence même de la voie non-canonique n'est plus contestée. Toutefois, cette constatation implique un concept d'intégration différentielle de la transduction initié par un même signal et pourrait être expliquée par deux hypothèses. Premièrement, les composantes de la voie canonique pourraient avoir des fonctions inconnues et médier la réaction du cône de croissance face à Shh. Deuxièmement, Shh pourrait agir à travers une voie de signalisation complètement distincte, notamment à

CHAPITRE I

travers la liaison à d'autres récepteurs. Le cumul grandissant d'évidences sur le guidage par Shh indique que les deux hypothèses seraient partiellement valides : la voie non-canonique serait à la fois constituée d'éléments de la voie classique et de composantes n'ayant pas été auparavant connectées à la voie Shh. En d'autres termes, les voies canonique et non-canonique auraient toutes deux des effecteurs communs et des régulateurs qui leur sont propres. Ainsi, toutes ces composantes des voies canonique/non-canonique impliquées dans le guidage par Shh travaillent de concert pour réguler le remodelage du cytosquelette au sein du cône de croissance de l'axone en migration.

5. REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE

5.1. Composantes du cytosquelette

Les cellules doivent être en mesure de réorganiser leurs composantes internes ainsi que d'adapter leur morphologie cellulaire en accord avec leur environnement. Elles y parviennent grâce à un réseau remodelable de filaments, appelé le cytosquelette. Trois types principaux de filaments forment le cytosquelette : les filaments intermédiaires, les microtubules et l'actine ; ces trois types de filaments étant un assemblage de plus petites sous-unités.

5.1.1. Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires apportent à la cellule une force mécanique et une résistance au stress de tension. Ils sont composés de « protéines des filaments intermédiaires », une famille nombreuse et hétérogène. Les neurofilaments constituent la classe majeure de filaments intermédiaires trouvés chez les cellules nerveuses.

5.1.2. Microtubules

Les microtubules, en plus de conférer un certain rôle de support, sont essentiels pour le déplacement intracellulaire des composantes de la cellule (organelles, vésicules, etc.) Les microtubules sont assemblés en forme de cylindre à partir de monomères de tubuline.

5.1.3. Actine

Les filaments d'actine sont requis pour le déplacement de la cellule et déterminent la forme de la surface cellulaire. Les filaments d'actine constituent des polymères composés de protéines d'actine, beaucoup plus flexibles que les microtubules. L'actine présente sous la forme polymérisée peut être appelée l'actine-F (Filament), tandis qu'on réfère plutôt à

CHAPITRE I

l'actine-G (Globulaire) pour les monomères d'actine. Les filaments d'actine sont très dynamiques et sont sujets à être réorganisés sous l'influence de divers signaux. Il existe un niveau supérieur d'assemblage de ces filaments où ceux-ci s'organisent en *faisceaux d'actine* et en *réseaux d'actine*. L'arrangement des faisceaux et réseaux d'actine déterminent la formation de trois structures ayant des rôles différents : les fibres de stress, les lamellipodes et les filopodes. Les fibres de stress sont engendrées lorsque les filaments d'actine sont arrangés en faisceaux contractiles ; elles sont associées à une augmentation de l'adhérence et à la rétraction cellulaire (inhibant la motilité). Ensuite, lorsque les filaments d'actine sont assemblés en faisceaux serrés, il y a formation de filopodes, qui sont des projections allongées pointant vers l'extérieur de la cellule, permettant de scruter l'environnement extracellulaire. Finalement, si les filaments sont disposés en un réseau d'actine étendu en filet, il y aura formation d'ondulations membranaires, puis de lamellipodes. Les lamellipodes, des structures en forme de feuillets, sont requises pour le déplacement de l'entité cellulaire ou l'élongation d'une portion de la cellule (Albert et al., 2002a; Lodish et al., 1997).

5.1.4. Implications des composantes du cytosquelette lors du guidage axonal

Pendant la migration axonale, le neurone projette son axone qui naviguera dans l'environnement extracellulaire jusqu'à ce qu'il atteigne sa cible. Au bout de l'axone est situé le cône de croissance, une structure hautement dynamique qui remodèle sans cesse son cytosquelette.

Avant de pouvoir avancer de façon appropriée, le cône de croissance requière des points d'attaches. L'adhésion peut se faire envers d'autres cellules ou envers les composantes de la matrice extracellulaire. Cette propriété du cône de croissance est exploitée dans le cas de molécules de guidage répulsives « anti-adhésives », qui peuvent venir empêcher l'axone de pénétrer dans certaines régions. Il fut suggéré que la liaison du cône de croissance aux substrats adhésifs engendre la formation de complexes qui viendraient relier les récepteurs impliqués et les filaments d'actine, créant ainsi des protusions d'actine poussant vers le substrat adhésif. Les filopodes sont particulièrement en charge d'établir les contacts avec les points adhésifs de l'environnement.

Toutefois, le cône de croissance ne fait pas simplement qu'avancer : il avance, tourne, se rétracte et pause; ces actions étant en réaction aux signaux perçus lors de sa navigation.

CHAPITRE I

Ainsi, lorsque le cône de croissance détecte une molécule de guidance et initie un virage, il s'agit en fait plutôt d'un biais envers une direction en particulier. Le cône de croissance se réorganise alors et polymérise sa structure d'actine en direction de la source chimio-attractante. Les microtubules présents dans la partie centrale du cône de croissance s'avancent ensuite pour consolider la direction choisie. En comparaison de l'actine, les microtubules et les neurofilaments remplissent plutôt un rôle de soutien, étant beaucoup moins sujet à de prompts changements que la périphérie du cône de croissance. Du côté opposé à la direction choisie, l'axone doit se défaire de ses points d'attache afin de favoriser la progression vers la direction choisie par l'axone. De façon globale, le cône de croissance peut donc tourner lorsque la réorganisation du cytosquelette se fait de façon asymétrique au sein du cône de croissance (Albert et al., 2002b; Dickson, 2002; Koh, 2006; Lowery and Van Vactor, 2009).

5.2. Dynamiques de remodelage de l'actine

Le cytosquelette d'actine est constamment en réarrangement, composé de filaments qui se polymérisent et se dépolymérisent à chaque extrémité. Bien que les deux extrémités soient dynamiques, le filament d'actine est polarisé et montre un côté qui se polymérise/dépolymérise plus rapidement. Ce côté est nommé l'extrémité « plus » (+) et l'autre, l'extrémité « moins » (-). Lorsque les deux extrémités du polymère d'actine sont exposées, il peut s'établir un équilibre où il y a autant de polymérisation d'un côté que de dépolymérisation de l'autre ; cet état est souvent qualifié de « tapis roulant ». Cet équilibre peut être perturbé lorsque certaines protéines se lient à l'une des extrémités pour inhiber ou catalyser la polymérisation d'actine.

5.3. Régulation du remodelage d'actine par les petites GTPases Rho

5.3.1. Fonctionnement des protéines de type GTPase

Les petites GTPases possèdent toutes la propriété de lier les molécules de guanosine triphosphate (GTP) et de guanosine diphosphate (GDP), associé à leur activité de guanine triphosphatase (c'est-à-dire, capable de cliver le GTP en GDP). Cette capacité d'être chargées soit d'un GDP, soit d'un GTP, confère aux GTPases un rôle de régulateurs binaires, souvent qualifié d'« interrupteurs » moléculaires. Elles oscillent ainsi entre leur

CHAPITRE I

forme active (liées au GTP) et leur forme inactive (liées au GDP) sous l'influence de plusieurs signaux cellulaires.

5.3.2. Les petites GTPases de la famille Rho

La superfamille des petites GTPases (aussi appelée la superfamille des GTPases Ras) est séparée en 5 familles : Ras, Arf, Rab, Ran et Rho. La famille Ras comprend les premières GTPases identifiées, qui ont été énormément étudiées depuis leur découverte, notamment pour leurs rôles dans le cancer. Les familles Arf et Rab comportent des membres ayant surtout été impliqués dans le trafic vésiculaire, tandis que les GTPases Ran sont impliquées dans le transport cytoplasme/nucléaire et l'organisation des microtubules. Les membres de la famille des Rho régulent quant à eux l'organisation du cytosquelette

Tableau I: effecteurs des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42

Effecteur potentiel	Type de protéine	Fonction	Sélectivité de liaison aux petites GTPases Rho	
WASP, N-WASP	Protéine d'échafaudage	Organisation de l'actine	Cdc42	
PAK4	Sérine/thréonine-kinase	Actine	Cdc42	
MRCK α , MRCK β	Sérine/thréonine-kinase	Actine	Cdc42	
IQGAP1,2	Protéine d'échafaudage	Actine/contacts cellule-cellule	Cdc42	Rac
PAK1, 2, 3	Sérine/thréonine-kinase	JNK/actine	Cdc42	Rac
Mik2, 3	Sérine/thréonine-kinase	JNK	Cdc42	Rac
MEKK1, 4	Sérine/thréonine-kinase	JNK	Cdc42	Rac
WAVE/ Scar	Protéine d'échafaudage	Organisation de l'actine		Rac*
POR-1	Protéine d'échafaudage	Organisation de l'actine		Rac
p140Sra-1	Protéine d'échafaudage	Organisation de l'actine		Rac
Dia1, Dia2	Protéine d'échafaudage	Organisation de l'actine		Rho
ROK α , ROK β	Sérine/thréonine-kinase	Actine/myosine		Rho
Kinectin	Protéine d'échafaudage	Liaison aux kinésines		Rho
MBS	Sous-unité de phosphatase	Inactivation des MLC		Rho
Rhotekin	Protéine d'échafaudage	Inconnue		Rho

Adaptation à partir de données disponibles dans une revue par Bishop et Hall. 2000

* Un lien fonctionnel a été décrit, mais pas une interaction directe

d'actine et l'expression de certains gènes. La famille Rho comprend 22 membres connus, dont les protéines RhoA, Cdc42 et Rac1, jugées incontournables pour réguler le cytosquelette d'actine. À eux trois, ces protéines contiennent le pouvoir de remodeler différenciellement le cytosquelette selon le contexte biologique, grâce entre autres à la diversité des effecteurs que ces GTPases activées peuvent lier. Plus d'une cinquantaine d'effecteurs pour RhoA, Rac1 et Cdc42 ont été identifiés, incluant des tyrosine-kinases, des sérine/thréonine-kinases, des lipides-kinases, des lipases, des oxydases et des protéines

CHAPITRE I

d'échafaudage (se référer au tableau I pour une liste de certains effecteurs (Bishop and Hall, 2000; Jaffe and Hall, 2005; Takai et al., 2001).

5.3.2.1. RhoA

Chez les mammifères, la protéine « Ras homologous » (Rho) possède trois isoformes ; RhoA, RhoB et RhoC (RhoA étant le membre prototypique du groupe). L'activation de RhoA mène à la formation de fibres de stress, lesquelles sont associées à une augmentation d'adhérence de la cellule. RhoA est associé à la rétraction des structures cellulaires en élongation. Dans les cellules en migration, RhoA est activé dans la partie opposée au front de migration (Hall, 2005; Jaffe and Hall, 2005; Ridley and Hall, 1992). Étonnamment, de nouvelles techniques de visualisation des GTPases permet d'observer que RhoA activé serait aussi présent à l'avant de la cellule et viendrait participer à la dynamique du front de migration, à la fois dans les neurones et les cellules en migration (Kurokawa et al., 2005; Nakamura et al., 2005). La signification biologique de cette localisation est activement en cours d'investigation. RhoA activé produit ses effets via deux effecteurs majeurs : les Rho-kinases (souvent appelées « ROCK ») et les protéines « Diaphanous » (Dia), faisant partie de la famille des Formines. Tous deux promouvoient à la fois la formation de filaments et de faisceaux d'actine. Les Formines fonctionnent en liant l'extrémité « + » des filaments d'actine pour faciliter l'incorporation de monomères d'actine. Quant à ROCK, ce facteur active la kinase LIMK, qui va ensuite phosphoryler et inactiver la cofiline, qui est un facteur de dépolymérisation des filaments d'actine (Govek et al., 2005).

5.3.2.2. Cdc42

La protéine « Cell Division Cycle 42 » (Cdc42) est la seule protéine de type Cdc parmi la famille des GTPases Rho. L'activation de cette GTPase est reliée à la formation de filopodes (Nobes and Hall, 1995). En fait, l'activation de Cdc42 est associée à divers processus survenant de façon asymétrique au sein de la cellule (Hall, 2005). Pendant l'élongation des neurites, la forme activée de Cdc42 est concentrée complètement à l'avant de la cellule en croissance, particulièrement dans les projections (Aoki et al., 2004). Cdc42 induit ses effets sur le cytosquelette en liant différents effecteurs. Parmi les principaux effecteurs de Cdc42, on compte les protéines « Wiskott-Aldrich Syndrome Protein » (WASP, souvent référé à N-WASP qui est plus largement exprimée), qui active le complexe Arp2/3. Le complexe Arp2/3, qui est composé de 7 protéines, est capable

CHAPITRE I

d'induire la polymérisation d'actine. Les WASP eux-mêmes peuvent également lier l'actine-G et faciliter ainsi la polymérisation du filament d'actine (Machesky and Insall, 1998; Miki and Takenawa, 2003). Cdc42 activé est également capable de lier la kinase « p21-activated kinase » (PAK), menant ainsi à l'activation de cette dernière. PAK a pour substrat la protéine LIMK qui vient stimuler la formation d'actine-F en inhibant la cofiline (Jaffe and Hall, 2005). Cdc42 a aussi pour effecteur la protéine Toca-1, qui peut lier et activer N-WASP pour promouvoir l'induction d'actine-F.

De façon intéressante, lors de la migration cellulaire, un rôle auxiliaire de Cdc42 est également d'influencer la réorganisation asymétrique des microtubules pour aligner l'appareil de Golgi et les centrosomes en direction du front de migration. L'activation des intégrines à l'avant de la cellule viendrait médier l'activation GSK3 de façon Cdc42-dépendante (Etienne-Manneville and Hall, 2003).

5.3.2.3. Rac1

La protéine « Ras-regulated C3 botulinum toxin substrate » (Rac) comprend trois isoformes : Rac1, Rac2 et Rac3. Parmi ces trois, Rac1 est la plus étudiée et fut caractérisée pour sa capacité à induire des lamellipodes au sein de cellules en culture. Rac1 est associée à un rôle pro-migratoire, étant requis pour pousser le front de migration de la cellule vers l'avant. Lors de l'extension des neurites, Rac1 activée est localisée vers l'avant du front de migration, de façon plus diffuse que Cdc42 (Aoki et al., 2004). Afin de remplir ses fonctions sur le remodelage du cytosquelette, Rac1 fait également appel au complexe Arp2/3. Toutefois, Rac1 utilise plutôt les protéines WAVE (membres de la famille WASP) pour activer le complexe Arp2/3 et ainsi promouvoir de façon semblable la formation de filaments d'actine. Rac1 et Cdc42 ont pour effecteur commun la protéine PAK, qui montre donc une activité Cdc42- et Rac1-dépendante. Quelques effecteurs impliqués dans le remodelage d'actine exclusifs à Rac1 sont connus, tels que la protéine « Partner of Rac » (PoR-1), ayant un rôle dans la formation de lamellipodes, et le facteur « Specific Rac1-associated protein » (p140Sra-1), qui co-sédimente avec les filaments d'actine.

5.3.3. Implications des petites GTPases Rho lors du guidage axonal

Les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 contrôlent le remodelage incessant du cytosquelette dans le cône de croissance, qui est hautement dynamique conséquemment à sa capacité de réagir rapidement aux molécules présentes dans l'environnement extracellulaire.

CHAPITRE I

À l'aide de formes mutantes de Rac1 et Cdc42, il fut démontré que ces protéines sont requises pour la croissance des neurites et qu'elles induisent la formation de lamellipodes et de filopodes (respectivement) au sein du cône de croissance. En contraste à cet effet, l'activité de RhoA au sein du cône de croissance régule l'effondrement de celui-ci et l'inhibition de cette GTPase (à l'aide d'une drogue bloquant son activité) induit la croissance des neurites (Kozma et al., 1997). Les effets contraires de Rac1/Cdc42 et RhoA impliquent une compétition de leur action au sein du cône de croissance et pointent vers l'existence de mécanismes pour réguler leurs effets antagonistes. Un mécanisme proposé découle de l'observation que RhoA activé peut inhiber l'activation NGF-dépendante de Rac1 via la formation d'un anneau d'actine-F à la périphérie du cône de croissance. Cette structure d'actine empêcherait Rac1 d'être recrutée aux protrusions en réponse au NGF (Yamaguchi et al., 2001).

Un autre exemple précis dans un système de guidage est le rôle de Rac1 dans la répulsion via les Sémaphorines (voir section 4.3.1), qui fut décrit pour la première fois il y a plus de 10 ans à l'aide de neurones des ganglions dorsaux (Jin and Strittmatter, 1997). Depuis, il fut établi que RhoA et Rac1 sont requis pour médier le remodelage du cytosquelette associé à la répulsion Sémaphorine-dépendante via le récepteur Plexine-B (Driessens et al., 2001). Dans les neurones moteurs de drosophile, Rac1 activé interagit directement avec la queue cytoplasmique de la Plexine-B ; cette liaison vient inhiber les effets de Rac1 en séquestrant la GTPase hors de portée de son effecteur PAK, en plus d'augmenter l'activation de RhoA (Hu et al., 2001). La régulation de RhoA s'est avérée être ensuite expliquée par la présence d'un activateur. À partir de ce qui est connu, l'activité des GTPases est en effet plus souvent modulée par des régulateurs et l'exemple de Rac1 étant directement inhibé par un récepteur n'est pas un mécanisme commun pour gérer l'activité de ces molécules.

5.4. Régulation des petites GTPases Rho par les protéines GAP et les protéines GEF

Il existe trois types de protéines pouvant réguler l'activation des GTPases : les « GTPase Activating Protein » (GAP), les « Guanine nucleotide-Exchange Factors » (GEF) et les « Guanine nucleotide-Dissociation Inhibitors » (GDI). Les GDI fonctionnent en séquestrant la GTPase inactive et en régulant sa localisation sous-cellulaire. Les GEF et les GAP

CHAPITRE I

contrôlent quant à eux l'état binaire des GTPases, c'est-à-dire liées à un GTP ou liées à un GDP. Cette modulation des GTPases contient tout le raffinement de l'activité des GTPase requis pour engendrer une multitude d'événements cellulaires.

5.4.1. Les régulateurs négatifs des petites GTPases Rho (les protéines GAP)

Les GAP fonctionnent en venant accroître l'activité guanine-triphosphatase intrinsèque à la GTPase. Cette dernière vient alors cliver le guanine-triphosphate (GTP) pour générer un guanine-diphosphostate (GDP); la GTPase se retrouve ensuite sous sa forme inactive, lié au GDP.

Tableau II: protéines GAP et GEF régulatrices des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42

Protéine régulatrice	Type de régulateur	GTPase régulée		Effet médié par la régulation des GTPases
Vav	GEF	Rac1		Guidage axonal
Vilse	GAP	Rac1		Guidage axonal
STEF	GEF	Rac1		Formation des neurites
FIR	GEF	Rac1		Formation des neurites
Chimaerines	GAP	Rac1		Croissance des neurites, effondrement du cône de croissance
Tiam1	GEF	Rac1		Croissance des neurites; morphogenèse des épines dendritiques
DOCK9	GEF	Rac1	Cdc42	Croissance des neurites; morphogenèse des épines dendritiques
PIX	GEF	Rac1	Cdc42	Régulation des protrusions dendritiques
RICS	GAP	Rac1	Cdc42	Neurites plus courts
srGAP	GAP		Cdc42	Guidage axonal
Intersectine	GEF		Cdc42	Embranchement; formation des épines dendritiques
Grit	GAP		Cdc42 RhoA	Élongation des neurites
P190GEF	GEF		RhoA	Embranchement des neurites
p190RhoGAP	GAP		RhoA	Croissance des neurites
RA-RhoGAP			RhoA	Croissance des neurites
GEF KIAA03880	GEF		RhoA	Rétraction des neurites
PDZ-RhoGEF	GEF		Rho	Guidage axonal
Trio	GEF	Rac (GEF1)	RhoA (GEF2)	Croissance des neurites, guidage axonal
Kalirine	GEF	Rac (GEF1)	RhoA (GEF2)	Formation des épines dendritiques, extension et rétraction des neurites et de l'axone
Éphexine	GEF	Rac1	Cdc42 RhoA	Virage du cône de croissance

Adaptation à partir de données disponibles dans les revues par Tcherkezian et Lamarche-Vane (2007) et par Lowery et Van Vactor (2009)

Depuis l'identification de la première GAP en 1989, la famille des GAP s'est élargie au point de contenir plus de 70 membres chez les eucaryotes. Le nombre de GAP dépasse largement la quantité de protéines Rho; il semblerait que leur expression souvent tissu-spécifique expliquerait une partie de ce paradoxe. Plusieurs GAP sont exprimées dans le système nerveux, dont entre autres RICS, Grit, srGAP1, α 2-chimérine, Vilse, SYD-1, RARhoGAP, Nadrine et p190GAP (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007) (voir le tableau II pour une liste de régulateurs retrouvés dans le système nerveux (Lowery and Van Vactor, 2009; Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007)).

CHAPITRE I

Par exemple, le facteur RICS, qui est une GAP de Rac1 et Cdc42 sert à réguler l'élongation des neurites via l'inactivation de Cdc42. Chez la souris RICS^{-/-}, l'activité de Cdc42 est augmentée et induit des neurones d'hippocampe et de cervelet avec des neurites plus longs (Nasu-Nishimura et al., 2006).

5.4.2. Les régulateurs positifs des petites GTPases Rho (les GEF)

De façon globale, les GEF catalysent l'échange d'un GDP pour un GTP sur les GTPase. Plus précisément, la GEF lie tout d'abord la GTPase-GDP, qui relâche alors son GDP, menant à un complexe binaire. Ce complexe incorpore ensuite un GTP, menant ainsi à une GTPase activée. Les domaines responsables de cet effet sont donc souvent appelés les domaines *GEF*. Les protéines GEF sont d'ailleurs séparées en deux familles, définies par le domaine GEF qui leur est associé.

5.4.2.1. Les facteurs GEF de la famille Dbl

La protéine « Diffuse B-cell lymphoma » (Dbl) a été la première GEF identifiée, démontrée comme étant capable d'activer Cdc42 *in vitro* (Hart et al., 1991). D'autres membres de la même famille ont ensuite été identifiées et portent tous un domaine « Dbl Homology-pleckstrin homology domain » (DH-PH), qui est nécessaire pour l'activité de ces protéines. En plus de Dbl, cette famille inclut notamment les protéines Tiam1, Trio, LARG, PDZ, Vav, RhoGEF et Éphexine (voir le tableau II pour une liste de régulateurs retrouvés dans le système nerveux (Lowery and Van Vactor, 2009; Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007)). Tiam1 et STEF, toutes deux exprimées dans le SNC, engendrent la croissance de neurites grâce à leur capacité d'activer Rac1 (Leeuwen et al., 1997; Matsuo et al., 2002). Trio et la Kalirine possèdent la caractéristique de porter deux domaines GEF chacune, un étant dédié à Rac1 (et RhoG) et l'autre à RhoA (Koh, 2006).

5.4.2.2. Les Rho-GEF de la famille DOCK

Une seconde classe de GEF fut identifiée et se distingue des GEF de la famille Dbl par la présence de domaines « Dock Homology Region » 1 et 2 (DHR-1 et DHR-2). DOCK180 est le membre prototypique de cette famille de GEF évolutivement conservée contenant 11 membres. Cette famille peut être séparée en 4 groupes : les DOCK-A à -D. Les DOCK-A et -B sont des GEF de Rac1 seulement, tandis que les DOCK-D sont capable d'activer seulement Cdc42. Les DOCK-C sont des GEF à la fois pour Rac1 et Cdc42 (Cote and Vuori, 2007).

CHAPITRE I

La protéine DOCK180 fut d'abord identifiée comme un partenaire de CrkII, pouvant réguler la motilité et la morphologie de la cellule (Hasegawa et al., 1996). Depuis, DOCK180 et ses homologues, « Myoblast City » (MBC) chez la drosophile et CED-5 chez le nématode, ont été caractérisés comme des activateurs en amont de Rac1. Ils sont impliqués dans la migration cellulaire, le développement musculaire, la fermeture du tube neural, la croissance axonale, la phagocytose et l'englobement des corps apoptotiques (Erickson et al., 1997; Rushton et al., 1995; Wu et al., 2002; Wu and Horvitz, 1998). De plus, DOCK180 a récemment été mis en évidence pour médier la rétraction associée à la répulsion axonale via un récepteur EphB (Xu and Henkemeyer, 2009).

DOCK6 est plutôt impliqué dans la croissance des neurites via l'activation de Rac1 et Cdc42 (Miyamoto et al., 2007); tandis qu'un rôle pour DOCK9 fut récemment identifié dans la croissance dendritique (Kuramoto et al., 2009).

Elmo1

Un rôle pour la protéine Elmo1/CED-12 fut identifié au sein de la signalisation DOCK180/Rac1. Il a été démontré que Elmo1/CED-12 coopère avec DOCK180 pour activer Rac1 pendant la phagocytose et la migration cellulaire (Gumienny et al., 2001; Wu et al., 2001). Le complexe Elmo1/DOCK180 serait également impliqué dans la croissance des neurites (Kato et al., 2006). Elmo1 interagirait physiquement avec DOCK180 (deBakker et al., 2004) pour générer un complexe qui, selon certains groupes, est requis pour la pleine activation de Rac1, dans un contexte de migration cellulaire (Brugnera et al., 2002; Grimsley et al., 2004). Cependant, il semblerait que l'abolition de l'interaction entre Elmo1 et DOCK180 n'affecte pas l'activité GEF de cette dernière envers Rac1. La signalisation Rac en est cependant altérée, supposant ainsi un rôle pour Elmo1 dans la propagation du signal (Komander et al., 2008).

5.4.3. Implications des régulateurs des petites GTPases Rho dans le guidage axonal

La régulation des petites GTPases Rho lors du guidage axonal se fait principalement grâce à l'action des GEF et des GAP. Ces régulateurs font le pont entre le signal attractif ou répulsif, détecté par le récepteur à la surface cellulaire, et l'activation des GTPases contrôlant l'actine. Plusieurs mécanismes de guidage utilisant les GAP et les GEF ont été identifiés et seront décrits ici.

CHAPITRE I

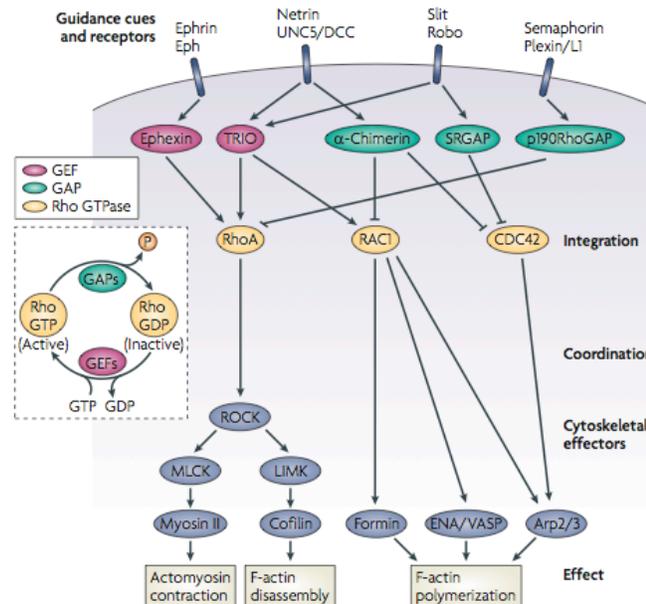


Figure 8. Schéma illustrant quelques voies de signalisation utilisées par différents systèmes de guidage pour contrôler le cytosquelette d'actine. Les molécules du guidage, présente à l'extérieur de la cellule, sont détectées via leur récepteur spécifique. Cette liaison vient activer les régulateurs des GTPases, des GAP ou des GEF, dépendant de l'action du ligand sur le cône de croissance. Les GTPases sont ensuite régulées et vont favoriser la polymérisation d'actine via Cdc42 et Rac1, ou la formation de fibres de stress via RhoA. (Schéma tiré d'une revue par Lawery et Van Vactor parue en 2009 (Lowery and Van Vactor, 2009))

5.4.3.1. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Sémaphorines

Rappelons que les Sémaphorines sont surtout associées à la répulsion axonale et que leurs actions engendrent un effondrement du cône de croissance et une rétraction de l'axone, associée à l'activation de RhoA et l'inactivation de Rac1.

La kinase Erb-2 peut interagir avec la queue cytoplasmique de la PlexineB ; en présence de Semaphorine4D, il y a stimulation de l'activité kinase de Erb-2 qui vient alors phosphoryler la PlexineB et Erb-2. Cette phosphorylation est requise pour l'activation de RhoA via les GEF LARG et PDZ-RhoGEF ; ces dernières avaient été démontrées auparavant comme pouvant lier directement la queue cytoplasmique de la PlexineB (Swiercz et al., 2004).

5.4.3.2. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Slits

Dans un contexte de migration de cellules neuronales, les facteurs Slits arrivent à médier leur effet répulsif en inactivant Cdc42. Lorsque les facteurs Slits lient leur récepteur Robo,

CHAPITRE I

il y a interaction du facteur « Slit-Robo srGAP » (srGAP) avec la queue cytoplasmique de Robo. La protéine srGAP vient alors inactiver Cdc42, engendrant une inhibition de la croissance du côté faisant face au gradient de Slit. Ce mécanisme serait potentiellement pertinent pour le guidage axonal via les Slits, puisque srGAP1 est exprimé dans plusieurs régions pertinentes pour le guidage axonal, telles que le tube neural, le bulbe olfactif, les cellules ganglionnaires de rétine et les neurones des ganglions dorsaux (Wong et al., 2001).

5.4.3.3. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Éphrines

La répulsion axonale médiée par les Éphrines a été décrite comme faisant appel à l'inactivation de Cdc42 et Rac1, ainsi qu'à l'activation de RhoA.

Il fut démontré que la queue cytoplasmique de EphA est capable de lier l'Éphexine, qui est une GEF intéressante en ce sens qu'elle active à la fois RhoA, Rac1 et Cdc42. Cependant, lorsqu'il y a interaction entre l'ÉphrineA et son récepteur EphA, il y a modulation de l'activité de l'Éphexine : l'activité GEF envers Rac2 et Cdc42 est inhibée tandis que l'activité envers RhoA est augmentée. Ces actions coordonnées par l'Éphexine engendrent l'effondrement du cône de croissance associé à la répulsion par l'ÉphrineA.

De plus, la liaison d'une ÉphrineB au récepteur EphA vient activer la GAP α -chimérine, qui peut alors inactiver Rac1 résultant en l'inhibition de la progression du cône de croissance (Iwasato et al., 2007).

5.4.3.4. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par les Nétrines

Récemment, la GEF Trio fut identifiée comme médiant l'activation Nétrine-dépendante de Rac1. Trio peut lier le récepteur de la Nétrine, DCC, bien que l'interaction Trio/DCC ne semble pas Nétrine-1 dépendante et serait requise pour un guidage adéquat des neurones commissuraux (Briancon-Marjollet et al., 2008). De façon intéressante, l'activation de Rac1 par la Nétrine-1 serait également dépendante de la protéine adaptatrice Nck (qui lie constitutivement la queue cytoplasmique de DCC) (Li et al., 2002).

Également, la Nétrine-1 requiert la kinase GSK3 (voir section 3.4.3) pour induire l'activation de MAP1B (un facteur impliqué dans la régulation d'actine et de microtubules) (Del Rio et al., 2004).

CHAPITRE I

5.4.3.5. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par NGF

L'élongation des neurites stimulée par le NGF (voir section 4.2.2) fait appel au récepteur TrkA, une protéine abondante dans les neurones. Lorsque le NGF lie son récepteur TrkA, il y a recrutement de Grit via les protéines adaptatrices Shc et Crk, qui ont été caractérisées en aval du récepteur activé. Grit est une GEF de RhoA et Cdc42, qui viendrait activer ceux-ci pour médier le croissance neuritale (Nakamura et al., 2002).

5.4.3.6. Implication des régulateurs des GTPases lors du guidage par Sonic hedgehog

Étant donné que l'étude du guidage par Shh est encore jeune, peu de choses sont connues concernant les mécanismes impliqués dans le guidage axonal Shh-dépendant. L'effet de Shh sur les GTPases Rho lors du guidage axonal n'a en fait jamais été caractérisé et relève de l'activation de la voie Shh non-canonique.

6. LA VOIE SONIC HEDGEHOG NON-CANONIQUE

L'avènement d'un rôle pour Shh au sein de phénomènes de guidage axonal a suggéré l'existence d'une voie Shh non-canonique. Cette voie expliquerait les phénomènes cellulaires se produisant indépendamment de la cascade classique aboutissant à l'activation des facteurs Gli. Ces processus incluent intuitivement tout événement cellulaire rapide qui ne nécessite aucune transcription. On peut ainsi inclure les phénomènes faisant appel au remodelage du cytosquelette, tel que la migration cellulaire et le guidage axonal.

6.1. Molécules impliquées dans une voie Shh non-canonique

Jusqu'à maintenant, la famille des kinases Src (SFK) constituent la seule classe de protéines n'ayant été associées qu'à la voie Shh non-canonique, puisque tous les autres régulateurs de la voie non-canonique ont été reportés pour avoir aussi un effet sur la voie transcriptionnelle.

6.1.1. La famille des kinases Src (SFK)

Depuis sa découverte en tant que premier oncogène humain, Src et les protéines qui lui sont reliées constitue une famille de facteurs comptant parmi les plus étudiés depuis l'avènement de la biologie moléculaire. La famille des kinases Src (SFK) inclue 9 membres (Src, Fyn,

CHAPITRE I

Yes, Fgr; Lck, Hck, Blk, Lyn et Frk) et sont impliquées dans le contrôle d'une multitude de processus incluant la régulation du métabolisme, la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration. Les SFK possèdent une structure avec un domaine « Src homolgy 3 » (SH3) pouvant lier les domaines riches en prolines (PRD), un domaine « Src homolgy 2 » (SH2) pouvant lier les motifs phospho-tyrosine et un domaine kinase qui leur confère leur activité. Des interactions intramoléculaires des SFK gardent la protéine en conformation inactive, via leurs domaines SH3 et SH2 liant respectivement un domaine PRD et un résidu tyrosine phosphorylé (souvent référé à « pY527 » chez Src), situés sur leur propre molécule. L'activation des SFK est associée à la phosphorylation d'une autre tyrosine (référant au résidu « pY416 »), située dans le domaine kinase, et à la perte du motif phospho-tyrosine sur le résidu Y527, induisant une libération du domaine SH2. L'activation des SFK engendre également un changement de conformation, induisant le déplacement des domaines d'interaction, maintenant disponibles pour leurs substrats et autres molécules régulatrices (Boggon and Eck, 2004; Ingley, 2008).

Les SFK sont impliquées notamment dans la croissance des neurites (Beggs et al., 1994; Suetsugu et al., 2002) et l'effondrement du cône de croissance médié par Slit (Wong et al., 2004). De plus, il fut démontré que les SFK sont requises pour l'attraction et la croissance des neurones induites par la Nétrine-1 (Liu et al., 2004) via son récepteur DCC (Li et al., 2004; Meriane et al., 2004). Les SFK furent aussi impliquées dans la signalisation du guidage axonal via les protéines Éphrines (Knoll and Drescher, 2004) et Sémaphorines (Falk et al., 2005).

6.1.1.1. Activation des SFK

Les SFK peuvent être modulées par plusieurs facteurs, dont le plus connu est probablement le régulateur négatif de Src appelé « Src tyrosine kinase » (Csk), qui est responsable de la phosphorylation sur la tyrosine 527 (promouvant donc la conformation inactive de la molécule) (Boggon and Eck, 2004). D'autres régulateurs viennent activer les SFK tandis qu'ils en sont le substrat, comme les récepteurs tyrosine-kinase et la « Focal Adhesion Kinase » (qui seront abordés en même temps que les autres substrats des SFK).

Les SFK au sein de la signalisation des RCPG

Bien qu'elles aient longtemps été étudiées indépendamment, il semblerait que les SFK sont des effecteurs directs des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Luttrell and Luttrell,

CHAPITRE I

2004). Il a été suggéré que les SFK peuvent, dans certains contextes, lier directement le RCPG grâce à un motif phospho-tyrosine placé sur la queue cytoplasmique du récepteur (Fan et al., 2001). Un autre mode de régulation impliquerait une modulation de l'activité des SFK par les sous-unités $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ (voir section 3.3.3), puisque l'incubation *in vitro* de $G\alpha$ mène à une activation de Src. Il fut proposé que la sous-unité $G\alpha$ vienne se lier au domaine catalytique de Src pour augmenter son activité kinase (Ma et al., 2000). Les β -arrestines (voir section 3.4.5) ont également été suggérées comme régulant l'activité des SFK, puisqu'elles peuvent lier directement Src et la recruter aux RCPG activés. Cette interaction β -arrestines/Src viendrait d'ailleurs augmenter l'activité spécifique de Src (Luttrell et al., 1999). Finalement, un des substrat important de Src est la protéine GRK2 (voir section 3.4.4) ; la phosphorylation de GRK2 est associée à une hausse de son activité (Sarnago et al., 1999).

6.1.1.2. Substrats des SFK contrôlant le remodelage du cytosquelette

Les substrats des SFK incluent une panoplie de molécules, dont les mieux caractérisés sont certains récepteurs tyrosine-kinases (RTK) impliqués dans la reconnaissance de facteurs de croissance. Il existe toutefois une gamme de substrats de Src spécialisés dans le remodelage du cytosquelette d'actine, incluant par exemple la protéine N-WASP (Suetsugu et al., 2002) et certains activateurs de Cdc42 (Miyamoto et al., 2003). La caractérisation de l'activité des SFK (particulièrement Src) sur le cytosquelette a surtout été influencée par la recherche portant sur les intégrines, qui sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire. Le rôle des SFK dans la transduction des intégrines les amène à phosphoryler différents substrats tels que la « Focal Adhesion Kinase » (FAK), p130^{CAS}, la Paxilline, Vav2, p190RhoGEF et la cortactine (Huveneers and Danen, 2009; Playford and Schaller, 2004).

FAK

L'adhésion via les intégrines induit un changement de conformation de FAK lui permettant d'être phosphorylée par Src. Le complexe FAK/Src peut ensuite aller phosphoryler et activer différents substrats (Chodniewicz and Klemke, 2004). Ce complexe FAK/Src viendrait réguler le guidage axonal médié par les Sémaphorines (Falk et al., 2005) et par la Nétrine (Li et al., 2004), en plus d'être généralement requis pour le guidage approprié des neurones commissuraux (Robles and Gomez, 2006).

CHAPITRE I

p130^{CAS}

Plus précisément, le complexe actif FAK/Src active la protéine d'échafaudage p130^{CAS}. L'activation de p130^{CAS} permet à celle-ci de recruter le complexe DOCK180/Elmo1 via son association avec CrkII. Le complexe DOCK180/Elmo1 régule positivement Rac1 (voir section 5.4.2.2) (Huveneers and Danen, 2009). Le facteur p130CAS est requis pour le guidage axonal Nétrine-dépendant des neurones commissuraux (Liu et al., 2007) ; tandis que FAK et p130CAS ont été conjointement impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine induit par une Éphrine-A (Carter et al., 2002).

Paxilline

Le complexe FAK/Src peut aussi aller phosphoryler la paxilline, une protéine d'échafaudage qui ira recruter β -Pix, qui est une GEF de Rac1 et Cdc42. L'interaction β -Pix/Rac1 serait requise pour la formation d'adhésions focales et d'ondulations membranaires (ten Klooster et al., 2006). Il a été décrit que la paxilline est activée dans les points de contact de neurones du tube neural mis en culture (Robles and Gomez, 2006).

Vav2

Les intégrines peuvent aussi promouvoir l'étalement cellulaire via la phosphorylation Src-dépendante du facteur Vav2, qui est une GEF de Rac1 (Marignani and Carpenter, 2001). Vav2 est un facteur également impliqué dans le guidage axonal par les Éphrines (Cowan et al., 2005).

p190RhoGAP

Un engagement des intégrines mène aussi à la phosphorylation de p190RhoGAP médiée par Src. Comme son nom l'indique, p190RhoGAP est un régulateur négatif de RhoA (Arthur and Burridge, 2001; Arthur et al., 2000). p190RhoGAP fut suggérée comme étant le substrat principal de Src dans le cerveau, en charge de réguler la croissance et le guidage des axones (Brouns et al., 2001).

Cortactine

Finalement, la transduction de intégrines mène aussi à une activation Src-dépendante de la Cortactine. La protéine de cortactine, pouvant interagir avec les filaments d'actine ainsi que le complexe Arp2/3, fait partie des facteurs capables de promouvoir la polymérisation d'actine (au même titre, par exemple, que la protéine WASP) (voir section 5.3.2.2) (Daly, 2004; Vuori and Ruoslahti, 1995). La régulation de la cortactine par les SFK a été décrite

CHAPITRE I

dans le guidage axonal de neurones de la rétine via les récepteurs EphA (Knoll and Drescher, 2004).

6.2. Transduction cellulaire par une voie non-canonique

La compréhension du guidage médié par Shh en est encore à ses débuts, mais certains acquis sont indéniables dans l'identification du mécanisme impliqué. On sait par exemple que le guidage axonal Shh-dépendant requiert l'effecteur Smo, bien que celui-ci ne lie pas directement Shh (Charron et al., 2003), et la protéine Boc, qui est un récepteur pouvant directement lier Shh (Okada et al., 2006).

Des données de notre groupe (présentement sous presse) ont décrit de nouveaux aspects concernant la voie Shh non-canonique. Tout d'abord, il fut clairement démontré que la transcription spécifiquement médiée par les facteurs Gli, ainsi que la transcription en général, ne sont aucunement requises pour le guidage des neurones commissuraux par Shh. Également, un rôle pour les kinases de la famille Src (SFK) dans le guidage par Shh fut identifié. La présence de SFK phosphorylées (forme active des SFK) fut observée dans les neurones pré-croisement, ainsi que dans les cultures de neurones dissociés. Plus précisément, les phospho-SFK sont présentes au niveau du cône de croissance et leur détection est d'ailleurs augmentée en présence de Shh. Afin de valider biochimiquement ces observations, il fut également établi que l'activité kinase de Fyn et Src (qui sont fortement exprimées dans les neurones commissuraux) augmente après stimulation à Shh. Cette augmentation de l'activité de Src et Fyn induite par Shh est Smo-dépendante. De plus, le rôle de Boc au sein de la voie non-canonique fut investigué. En cellules en culture, Boc surexprimé potentialise l'activation des SFK induite par Shh. Il fut aussi déterminé que cette activation des SFK induite par Shh est bien soutenue par une voie indépendante de toute transcription.

Chez les neurones en présence d'un gradient stable de Shh, la distribution de phospho-SFK a même démontré un biais en se concentrant vers le côté du cône de croissance faisant face à la source de Shh. Cette activité asymétrique des SFK viendrait moduler le guidage, puisqu'un gradient d'inhibiteur des SFK repousse les axones. Finalement, il fut démontré, par deux moyens différents, que les SFK sont requises pour l'attraction des neurones commissuraux vers Shh (Yam et al., 2009 in press).

CHAPITRE I

De toutes ces données se dégagent une relation claire où Shh contrôle l'activité des SFK par un processus indépendant de la transcription par les facteurs Gli, mais dépendant des protéines Smo et Boc. Toutefois, tout mécanisme reliant entre elles ces protéines est encore nébuleux et reste à être davantage investigué.

7. RAISONNEMENT ET OBJECTIFS

Considérant le lien potentiel pour une régulation des GTPases dans le guidage axonal médié par Shh, nous nous sommes tout à bord intéressés à savoir si Shh pouvait avoir un effet sur l'activation de Rac1 et Cdc42. Dans l'éventualité où Shh entraîne un effet sur les GTPases Rac1 et Cdc42, une caractérisation de l'activation Shh-dépendante dans les neurones commissuraux serait alors entreprise. Une telle caractérisation représenterait la première preuve d'un effet du morphogène Shh sur des petites GTPases Rho.

Étant donné que l'effet attractif de Shh requiert le récepteur Boc (Okada et al., 2006), nous avons cherché à identifier des modifications de ce récepteur induites par Shh. Aucune modification ou activation de Boc après ajout de Shh n'avait encore été reportée ou observée quand mon projet fut entrepris. Nous avons misé sur l'étude de la phosphorylation de la queue cytoplasmique du récepteur Boc afin d'expliquer la transduction du signal Shh. Nous avons adopté une approche en lignée cellulaire afin de mesurer s'il y avait une phosphorylation de base de ce récepteur et si cette potentielle phosphorylation basale pouvait être modulée par la présence de Shh. En cas où une phosphorylation Shh-dépendante pouvait être observée, encore faudrait-il l'attribuer à l'action de certains effecteurs. Étant donné que l'activation des SFK peut être induite par Shh et que l'activité de celles-ci est requise pour le guidage axonal Shh-dépendant (Yam et al., 2009 in press), il est logique de croire que cette famille de protéines pourraient contribuer à la phosphorylation de Boc. De plus, étant donné que l'effecteur Smo est également requis pour le guidage par Shh, la phosphorylation de Boc pourrait également relever de l'activité de Smo. La contribution des activités Smo- et SFK-dépendantes à cette phosphorylation de Boc induite par Shh peut être évaluée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques pour les protéines SFK et Smo. Les expériences permettant de répondre à ces hypothèses furent entreprises et les résultats obtenus sont exposés au chapitre II et discutés au chapitre III du présent mémoire.

CHAPITRE II :

**« SONIC HEDGEHOG RAPIDLY STIMULATES THE ACTIVITY OF
THE SMALL RHO GTPASES RAC1 AND CDC42 IN COMMISSURAL
NEURONS»**

CHAPITRE II

**SONIC HEDGEHOG RAPIDLY STIMULATES THE ACTIVITY OF THE SMALL
RHO GTPASES RAC1 AND CDC42 IN COMMISSURAL NEURONS**

Jessica MT Pham^{1,3}, Steves Morin¹ and Frédéric Charron^{1,2,3,4}

¹ Molecular Biology of Neural Development

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

110 Pine Ave West,

Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7

² Department of Medicine,

University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³ Molecular Biology Program,

University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

⁴ Department of Anatomy and Cell Biology and Department of Experimental Medicine

McGill University, Montreal, Quebec, Canada

CHAPITRE II

CONTRIBUTION DES CO-AUTEURS

Pour l'article « Sonic Hedgehog rapidly stimulates the activity of the small Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in commissural neurons », Jessica My Trang Pham a effectué les expériences d'où découlent tous les résultats présentés, à l'exception de la figure 4c qui est tirée d'expériences faites par Steves Morin. L'élaboration des expériences, la mise en figure des résultats ainsi que l'écriture de l'article furent réalisées par Jessica My Trang Pham, sous la supervision du Dr. Frédéric Charron.

CHAPITRE II

RÉSUMÉ

Le morphogène Sonic hedgehog (Shh) est requis pour le guidage axonal des neurones commissuraux lors du développement de la moelle épinière, phénomène impliquant des événements de réorganisation du cytosquelette d'actine. Bien qu'il soit généralement admis que le cytosquelette d'actine soit régulé via les petites GTPases de la famille Rho, un effet de Shh sur ces protéines clés n'a jamais été observé dans aucun contexte physiologique. Nous démontrons ici que Shh active les petites GTPases Rac1 et Cdc42, tant en lignées cellulaires qu'en culture primaire de neurones commissuraux embryonnaires. Cette activation de Rac1 et Cdc42 est rapide (de l'ordre de 20 minutes) et donc, compatible avec les effets de guidage induits par Shh sur les neurones commissuraux. En parallèle, nous avons observé que Shh induit une augmentation de la phosphorylation en tyrosine de la protéine Boc (un récepteur à Shh requis pour le guidage axonal) de façon dépendante de l'activité de l'effecteur Smoothened et des kinases de la famille Src (SFK), constituant ainsi une piste pour expliquer comment Shh induit son effet jusqu'aux petites GTPases Rac1 et Cdc42.

Mots clés: Shh, Cdc42, Rac1, GTPase(s), neurones commissuraux, Boc, phosphorylation en tyrosine, kinases de la famille Src (SFK)

CHAPITRE II

ABSTRACT

Sonic hedgehog (Shh) is required for axon guidance of commissural neurons during spinal cord development, which involves reorganization of the actin cytoskeleton. Although it is known that this process is regulated by small Rho GTPases, an effect of Shh on these key proteins has not been clearly demonstrated. In this study, we show that Shh activates the small GTPases Rac1 and Cdc42, both in cell line models and primary cultures of embryonic commissural neurons. This activation of Rac1 and Cdc42 occurs rapidly (i.e. 20 minutes), which is compatible with the guidance effects of Shh on commissural neurons. In parallel, we observed a Shh-mediated increase of tyrosine phosphorylation on the Boc protein (which is a Shh receptor required for axon guidance) that is dependent on the activities of the effector Smoothed and the Src Family Kinases (SFK). This contributes to our understanding of how Shh induces its effect on Rac1 and Cdc42.

Keywords: Shh, Cdc42, Rac1, GTPase(s), commissural neurons, Boc, tyrosine phosphorylation, Src Family Kinases (SFK)

CHAPITRE II

INTRODUCTION

Guidance molecules are key modulators of axon pathfinding during embryogenesis. Axons are guided to their target by repulsive and attractive cues, which are sensed by the growth cone¹. A classic model to study axon guidance is the analysis of commissural neuron projections in the developing neural tube, as these axons encounter multiple choice points along the path to their destination. During embryogenesis, commissural neurons send their axons from the dorsal neural tube to the ventral midline, where they cross the midline, thus creating a commissure at the floor plate of the neural tube. Commissural axons are attracted to the ventral region of the neural tube by a gradient of Netrin-1 produced by floor plate cells². However, abrogation of Netrin-1 expression in the neural tube does not completely inhibit commissural neuron attraction³; suggesting that additional attractive guidance cues are secreted by the floor plate. This additional guidance cue was later found to be Sonic hedgehog (Shh)⁴, an evolutionary conserved morphogen previously characterized for its ability to determine ventral identity of neural tube neurons. The activity of the 7-transmembrane protein Smoothed (Smo), which was already known to be essential for activation of the canonical Shh pathway and necessary for cell fate specification, is also required for the attractive effect of Shh on commissural neurons.

Recently, Cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes (Cdo) and Brother of Cdo (Boc) were shown to function as novel Shh receptors, but only Boc was reported to be required for commissural neuron axon guidance⁵. Boc and Cdo are related type I transmembrane proteins comprise an extracellular domain which contain four to five immunoglobulin (Ig) domains and two to three fibronectin type III (FNIII) repeats. Moreover, they both show a high degree of similarity with other known receptors

CHAPITRE II

implicated in axon guidance, such as the Slit receptor Roundabout (Robo1) and Deleted in colorectal cancer (DCC), which is a Netrin-1 receptor⁶.

Moreover, it was shown that axon guidance receptors, such as the Netrin receptors (DCC⁷ and UNC5⁸ family members) and Ephrin receptors (members of EphA and EphB families^{9,10}) are tyrosine-phosphorylated once stimulated with their ligand. In fact, this post-transcriptional modification is likely to be globally required for signal transduction, since impairing tyrosine phosphorylation causes axon extension defects^{11,12}. Signal transduction by tyrosine phosphorylation of axon guidance receptors seems highly linked to Src Family tyrosine Kinases (SFK)^{13,14,7}. SFK comprise nine members: Src, Fyn, Yes, Fgr, Lck, Hck, Blk, Lyn, Frk¹⁵. SFK have been shown to be essential for proper outgrowth of neurites^{16,17} and to be required for Netrin-mediated chemoattraction and outgrowth activity^{18,14,7}. Recent work from our group revealed that Shh promotes the attraction of axons through SFK activity¹⁹. Interestingly, inhibition of transcription did not affect axon guidance, thus suggesting that Shh might be activating a signaling cascade that promotes axon guidance through actin cytoskeletal remodeling.

SFK have been shown to regulate cytoskeleton remodeling, notably by activating N-WASP¹⁷ and small Rho GTPases. SFK act on small Rho GTPases by activating positive regulators of Rac1²⁰ and Cdc42²¹ and negative regulators of RhoA²². Guanine Exchange Factors (GEF) promote the active state of the GTPase, by catalysing GTP loading, whereas GTPase Activating Proteins (GAP) function as negative regulators by driving the hydrolysis of GTP to GDP, rendering the GTPase inactive²³. GTPases, being able to alternate between active/inactive states, are often referred as molecular switches for signal transduction in the cell. While active Rac1 and Cdc42 promote actin polymerization

CHAPITRE II

resulting in cell migration and axon elongation, active RhoA triggers actin remodeling leading to retraction effects, such as growth cone collapse or increased adherence^{24,25,26}.

Our goal was to elucidate the molecular mechanism downstream of Shh-dependent axon guidance. As Rac1 and Cdc42 promote actin polymerization, we investigated whether these molecules were implicated in Shh-mediated axon guidance. Here, we report that the morphogen Shh activates the small GTPases Rac1 and Cdc42 in both cell lines and primary cultures of embryonic commissural neurons. As well, we observed that Shh induced tyrosine phosphorylation of Boc, which was dependent on Smo and SFK activities. Taken together, our data suggests that Rac1 and Cdc42, as well as SFK, are part of the molecular mechanism that transduce Shh-dependent axon guidance.

RESULTS

Shh induces activation of the small GTPases Rac1 and Cdc42

Axon guidance is a dynamic phenomenon that involves quick remodeling of the actin cytoskeleton. Actin reorganization is controlled by small Rho GTPases, which are themselves modulated by upstream signals emanating either from intracellular or extracellular cues¹. Since Rho GTPases have been implicated in modulating axon pathfinding, we examined whether they mediated Shh-dependent commissural axon guidance. A role of GTPases in Shh-dependent axon pathfinding has never been reported. Thus, we investigated the activation of the small GTPases Rac1 and Cdc42 upon Shh stimulation using GTP loading assays (or Pak pull-down). In our case, one pull-down reveals activation levels for both GTPases, Pak being a common effector for Rac1 and Cdc42. We first ensured that the antibodies revealed specifically both endogenous and

CHAPITRE II

overexpressed Cdc42 or Rac1 (**figure S1A**). We also tested the sensitivity of the GTP loading assay using previously reported controls^{27,28} and observed that it was accurate to measure activity of endogenous Rac1 and Cdc42 (**figure S1B**). We then investigated if Shh could induce an activation of Rac1 and Cdc42. In order to do this, we stimulated cultured cells for 60 minutes with increasing concentrations of Shh and found that all doses tested activated both Rac1 and Cdc42; the strongest activations being observed with the 2.5nM and 5nM concentrations (**figure 1A**). The 5nM dose was chosen to perform the ulterior experiments. We next tested whether this dose could induce activation of Rac1 and Cdc42 in a timeframe suitable for axon guidance mechanisms, which occur in less than an hour. Cultured cells were briefly stimulated with 5nM of Shh and lysed to visualize GTPase activity. In HEK293T cells, activation of both Rac1 and Cdc42 was observed as quickly as 5 to 10 minutes following Shh treatment (**figure 1B**). In COS7 cells, we observed activation of both Rac1 and Cdc42 following a 20 minutes treatment with Shh (**figure 1C**). We next wanted to determine whether Shh activated Rac1 and Cdc42 in commissural neurons. To achieve this, we prepared primary cultures of commissural neurons dissected from stage E13.5 rat embryos¹⁹ and tested GTPases activation in these cells. We observed activation of both Rac1 and Cdc42 in commissural neurons after 20 minutes of Shh treatment (**figure 2**). Taken together, our data indicates that Shh promotes Rac1 and Cdc42 activation in both established cell lines and primary cultures of embryonic commissural neurons. This occurs within a timeframe consistent with events relating to actin cytoskeletal rearrangements and axon guidance.

Mapping of Boc cytoplasmic domains required for basal tyrosine phosphorylation

In order to further investigate how Shh signaling is transduced to small Rho GTPases, we

CHAPITRE II

focused on Boc, a Shh receptor required for axon guidance. Knowing that tyrosine phosphorylation is important for extension of the neuronal growth cone and required for signaling of several axon guidance cues, we examined whether tyrosine residues within the cytoplasmic tail of Boc were targeted for phosphorylation.

We generated deletion mutants of Boc in fusion with the GFP (Boc-GFP). No obvious predicted domains are present in the cytoplasmic region of Boc, thus, we created mutants lacking each half of the cytoplasmic tail and also generated a point mutant of Boc where tyrosine 899 was mutated to a phenylalanine (Y899F) (**figure 3A**). This tyrosine and the neighboring residues (Y-T-M/A-V-P) are conserved in Boc throughout vertebrate species, but also conserved between Boc and Cdo (mostly showing low conservation of its cytoplasmic tail with Boc). To assess that all mutants were properly expressed and localized, we verified subcellular localization of all Boc-GFP mutants by epifluorescence microscopy. As expected, we observed wild type Boc (Boc-WT-GFP) localized at the membrane and in the Golgi apparatus. All Boc-GFP mutants exhibited a subcellular localization similar to the wild type protein. While Boc- Δ cyto-GFP (lacking the cytoplasmic domain) showed slightly lower levels of expression, its subcellular localization was not affected (**figure 3B**). Expression of Boc-GFP mutants was also examined by immunoblotting (**figure 3C**). All mutants except Boc- Δ cyto were expressed at similar levels as Boc-WT-GFP, confirming the data obtained by microscopy.

To evaluate the phosphorylation status of tyrosine residues present within the cytoplasmic domain of Boc, lysates of cells overexpressing either Boc-WT-GFP or its mutant derivatives were immunoprecipitated using an anti-GFP antibody and phospho-tyrosine levels were assessed by immunoblotting using an antibody specific for phosphorylated

CHAPITRE II

tyrosine residues. We observed that Boc-WT-GFP exhibits a basal phospho-tyrosine signal, which is completely lost on Boc- Δ cyto-GFP (**figure 3D**). We concluded that the basal phospho-tyrosine signal was specific to the cytoplasmic tail of Boc-WT-GFP as it disappeared when the cytoplasmic tail is truncated. With the same method, we then looked at the phospho-tyrosine levels of Boc mutants to identify the region comprising the tyrosine(s) that are phosphorylated in the basal state. We observed that the phospho-tyrosine level decreased significantly with Boc- Δ 1-GFP, which lacks the proximal portion of the cytoplasmic tail (**figure 3E**). While the proximal region of the Boc cytoplasmic domain comprises Y899, mutation of this residue does not affect the basal phospho-tyrosine as Boc-Y899F-GFP still exhibits a significant level of tyrosine phosphorylation (data not shown). Thus, our results show that the proximal part of the cytoplasmic portion of Boc comprises basally phosphorylated tyrosine residue(s). However, either Y899 is not modified; or either it is modified, but the effect was not detected because other phospho-tyrosine motifs are still present on Boc.

Shh induces tyrosine phosphorylation of Boc, in a SFK- and Smoothened-dependent manner

We next wanted to test whether Shh modulated Boc tyrosine phosphorylation levels. Immunoprecipitation and phospho-tyrosine immunoblot were performed on cells stimulated with 5nM of Shh, for 20 minutes, which also stimulates GTPase activity. We observed an increase in tyrosine phosphorylation of Boc-GFP upon Shh stimulation when compared to the untreated control (**figure 4A**). Furthermore, ³²P labeling of COS7 cells transfected with Boc-GFP demonstrated that Shh treatment lead to a 2.5 fold increase in Boc phosphorylation when compared to unstimulated cells (**figure 4B**). To determine

CHAPITRE II

whether SFKs mediate Boc tyrosine phosphorylation, we stimulated COS7 cells with Shh in the presence of either PP2, a chemical inhibitor of SFK²⁹, or PP3, a structural analogue of PP2, which does not affect SFK activity³⁰. While PP2 inhibited Shh-mediated Boc tyrosine phosphorylation, PP3 had no effect (**figure 4C**). We next examined whether the increase in Boc phospho-tyrosine levels was dependent on Smo activity. COS7 cells expressing Boc-GFP were treated with Shh in presence or absence of SANT-1, an inhibitor of Smo activity³¹. SANT-1 treatment lead to a partial inhibition of Shh-induced Boc tyrosine phosphorylation (**figure 4C**). Taken together, these data suggest that Shh stimulation induces Boc tyrosine phosphorylation through a mechanism that requires both SKF and Smo activities.

DISCUSSION

Small Rho GTPases are key regulators of cytoskeletal reorganization, which occurs in every cell shape-remodeling phenomenon, including axon guidance^{25,32}. Commissural axons react to surrounding cues present in their environment, such as the Shh gradient released by floor plate cells of the neural tube. We report here that Rac1 and Cdc42 are activated in embryonic commissural neurons in presence of Shh. These results are consistent with the attractive effect of Shh on commissural neurons at that embryonic stage⁴ and the migration-promoting roles of activated Rac1³³ and Cdc42³⁴ in axon guidance contexts. The timeframe (20 minutes of Shh stimulation) is compatible with axon guidance mechanisms, which implicates response of the growth cone within few minutes. This timeframe is considered “short-term” compared to Shh-induced cell fate mechanisms involving transcriptional events showing their effect after hours or even days. In fact, our

CHAPITRE II

team has shown that commissural axons can still be attracted by Shh in presence of transcription inhibitors¹⁹. Taken together, these data suggest that Shh affects Rac1 and Cdc42 independently of the canonical pathway events, which acts through Gli transcription factors.

We also determined which Shh concentrations were optimal to activate Rac1 and Cdc42. Even though Shh concentration present in the neural tube *in vivo* has never been clearly quantified, a range of concentration emerged from cell specification experiments using embryonic spinal cord tissue³⁵. The 5nM concentration used in this study was shown to be able to induce differentiation of precursor cells of the neural tube tissue into motor neurons³⁵.

The dose and the timeframe of this Shh-mediated activation of Rac1 and Cdc42 was validated in a cellular *in vitro* model (HEK293T and COS7 cell lines) and in embryonic stage 13.5 commissural neuron primary culture, the latter confirming that Shh activation can occur in the right cell type and at the right time during development. Indeed, commissural neurons are exposed to Shh *in vivo* in the spinal cord during this developmental stage⁴.

After having characterized the Shh-mediated effect on small Rho GTPases, we then investigated possible mechanisms explaining how this effect could be transduced. We focused on Boc, which is required for commissural axon guidance⁵ and shows high resemblance to other axon guidance receptors, such as Robo1 and DCC⁵. More specifically, we focused on potential tyrosine phosphorylation events on Boc and generated Boc-GFP mutants. We observed that Boc's cytoplasmic tail indeed carried a basal phosphorylation and that most of it was carried by the proximal part of the cytoplasmic tail. We then asked

CHAPITRE II

whether this tyrosine phosphorylation could be modified by Shh. We observed, by measuring phospho-tyrosine levels and phosphate incorporation, that Boc was indeed phosphorylated after Shh stimulation, with the same timeframe and doses used for the GTP loading assays.

Because of the increasing amount of evidence leading to a role of the SFK in other axon guidance systems, we investigated if the observed increase of Boc's tyrosine phosphorylation was dependent on their activity. We found that the Shh-induced increase of the phospho-tyrosine signal on Boc is indeed dependent on SFK activity, raising the possibility that one of the SFK may directly phosphorylate Boc. This possibility is reinforced by recent data from co-immunoprecipitation experiments performed by our group showing that Boc and Fyn bind to each other *in vitro*. Furthermore, it was also determined that overexpression of both Boc and Fyn leads to higher phospho-tyrosine levels of Boc (unpublished data). Also, the kinase-activity of Fyn has been reported to be required for Netrin attraction in spinal cord axons^{18, 14, 7}.

It has previously been shown that Smo, which is an effector of the Shh canonical pathway, is required for axon guidance of commissural neurons⁴. We therefore tested if the increase of Boc phospho-tyrosine signal was dependent on Smo activity. We found that the activity of Smo was required for increase of tyrosine phosphorylation of Boc induced by Shh. This is especially interesting considering that axon guidance experiments performed with commissural neurons show that Smo activity is required for attraction by Shh⁴. It was also reported more recently that Smo activity is in fact required for Shh-induced SFK activation in embryonic commissural neuron cultures¹⁹.

It is also interesting to note that SFKs all contain SH2 domains, which can bind phospho-

CHAPITRE II

tyrosine motifs¹⁵. Therefore, in theory, SFK could bind to either Boc's basally phosphorylated tyrosine(s) or Boc's Shh-dependent phosphorylated tyrosine(s). Taken together, our data and previously published work suggests a transduction mechanism where Shh stimulation triggers Smo, which leads to activation of the SFKs (possibly Fyn), which then promote tyrosine phosphorylation of Boc.

We also can extend the role of SFKs in this process knowing that those molecules are implicated upstream of GEFs and GAPs, which control GTPase activation state. In fact, a GEF or a GAP is likely to be the missing link between the phosphorylated tail of Boc and a direct activation of Rac1 and Cdc42. Interestingly, in Slit and Netrin-1 guidance, their respective receptors (Robo1 and DCC) trigger signaling events through different binding partners, that have an impact on GTPase activation and cytoskeleton remodeling^{36,37}. More specifically, ligand binding to these receptors leads to a GEF or a GAP activation. For example, a GEF called Trio was recently reported to mediate signal transduction between DCC and Rac1 in Netrin-induced attraction of commissural neurons³⁸. Also, srGAP was shown to link the receptor Robo and the GTPase Cdc42 in Slit-mediated repulsion³⁶. In our case, the potential GEF(s) responsible for Shh-induced Rac1 and Cdc42 activation through the receptor Boc remains to be identified.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

DNA constructs

The coding sequence of mouse Boc (mBoc) in fusion with the green fluorescent protein (GFP) was cloned in pEGFP-N1 and pCAGGS/ES vectors. Boc-GFP in pCAGGS/ES was used to generate deletion mutants and point mutants (**figure 3a**). To obtain deletion

CHAPITRE II

mutants, portions of Boc's cytoplasmic tail were amplified by PCR and cloned in mBoc-GFP via BglIII and AgeI sites. The point mutant of a conserved tyrosine residue (Y899) to a phenylalanine was generated using Quick Change Multi Site Directed Mutagenesis KitTM (Stratagene). The binding domain of p21 of Pak, in fusion with GST, is cloned in pGEX-2T and was kindly provided by Dr. Jean-François Côté (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada). Cdc42-Myc and Rac1-Myc are cloned in pRK5 and were a gift from Dr. Nathalie Lamarche (McGill University, Montréal, Canada).

Cell culture and transfections

HEK293T and COS7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin (all from Gibco-Invitrogen). Cells were transfected 24 hours after plating with 5µg of DNA (in 10cm-dishes) or 1µg of DNA (in 6 well-plates) using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Shh-stimulated cells were serum-starved 24 hours after transfection. Biochemical studies were performed 48 hours after transfection.

Commissural neuron culture

Dorsal neural tubes from stage E13.5 rat embryos were isolated and placed in L15 medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (both reagents from Gibco-Invitrogen). Neural tubes were then washed with HBSS and treated with trypsin (final concentration of 0.15%) for 7 minutes (both from Gibco-Invitrogen). DNase I (Sigma) and MgSO₄ were then added to the neural tube preparation. Cells were spun and washed with HBSS. After a second centrifugation, cells were washed again with HBSS and dissociated using fire-polished glass Pasteur pipettes. Cells were then counted in presence of Trypan blue and plated in Neurobasal medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum and 2mM of L-Glutamine (all from Gibco-Invitrogen). Cell medium was

CHAPITRE II

changed 24 hours after plating for Neurobasal Growth Medium (Neurobasal; B27 supplement; 2mM L-Glutamine - all from Gibco-Invitrogen). Biochemical assays were performed 48 hours after plating.

Agonists and antagonists

Shh stimulations were performed for the indicated durations with 5nM as final concentration (unless stipulated otherwise, i.e. in dose determination experiments for example) using rh-Shh-C24II (R&D #1845-SH). Cells were treated with SANT-1, PP2 or PP3 45 minutes before Shh treatment. SANT-1 was added in cell medium to a final concentration of 400nM. PP2 and PP3 were put in medium to obtain a final concentration of 200nM. Treatment with a 100mM sodium chloride solution for 10 minutes was used as a positive control²⁷. PMA treatment consisted in adding phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in medium to a final concentration of 100nM, for 10 minutes²⁷. Insulin stimulation was conducted at a final concentration of 100nM for 3 minutes²⁸. FBS treatment was performed by adding fetal bovine serum (FBS) to a final concentration of 10% for 20 minutes.

Immunoprecipitation

Transfected COS7 cells were lysed in RIPA buffer (50mM Hepes pH7.4; 150mM NaCl; 10% glycerol, 1.5mM MgCl₂; 1% triton; 0.1% SDS, 1mM EDTA, 20mM NaF; 1mM Na₃VO₄; 1X Roche's *Complete* protease inhibitor). Clarified lysates were precleared with 30μL of 50:50 slurry of A/G Plus agarose beads (Santa-Cruz #SC-2203) for 30 minutes. Precleared cell lysates were then incubated with 4μg of anti-GFP polyclonal antibody (Invitrogen #A11122) and immune complexes were allowed to form for 2 hours. A/G Plus agarose beads were then added for one more hour of incubation at 4°C. Beads were washed

CHAPITRE II

three times with IpH 0.1% buffer (50mM Tris pH8.0; 150mM NaCl, 5mM EDTA; 0.1% NP-40; 20mM NaF; 1mM Na₃VO₄; 1X *Complete* protease inhibitor). Washed beads and the inputs were boiled in Laemmli buffer, loaded on 10% SDS-PAGE and analyzed by Western Blot using anti-phospho-tyrosine (BD Biosciences #610012) and anti-GFP (Invitrogen #A11122) antibodies.

³²P_i labeling of Boc-GFP

Transfected COS7 cells were incubated with 0,75mCi/mL of H₃³²PO₄ (MP Biomedicals #16401325) in presence of phosphate-free DMEM, one hour prior to Shh stimulation. Cells were stimulated with 8,3nM of Shh (R&D Systems #1845-SH) and anti-GFP immunoprecipitation were carried, followed by 10% SDS-PAGE. Labeled incorporated phosphate levels were revealed by autoradiography in presence of Spectroline intensifying screens.

GST-fusion protein production

GST fusion PBD-PAK1 (GST-PAK) was expressed in *Escherichia coli*. Bacteria were lysed by sonication in lysis buffer (0.1% Triton X-100 in PBS) and cleared extracts were incubated with Glutathione-agarose beads (Sigma) for 1h at 4°C. Beads were washed three times with lysis buffer. The amount of GST-PAK1 bound to the beads was quantified by SDS-PAGE and Coomassie staining.

GTP loading assay by GST-Pak pull-down

Cells were harvested and lysed in MLB (25mM Hepes pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1X Roche's *Complete* protease inhibitor). Cleared cell lysates were incubated with 5ug of GST-Pak fusion protein for 30 minutes. Washed beads and the inputs were then boiled in Laemmli buffer, loaded on 14% SDS-

CHAPITRE II

PAGE and analyzed by Western Blot using anti-Rac1 (Upstate #05-389) and anti-Cdc42 (Santa Cruz Biotechnology #SC-98) antibodies.

Data analysis

Autoradiography films obtained after Western Blot were scanned as high-resolution pictures. The extended histogram function of the Adobe Photoshop CS2 software was used to quantify the intensity of each band. The background of each film was also quantified and subtracted from the band intensities obtained. A fold ratio of the intensity of each band on the intensity of the control band (corresponding to the untreated samples) was made for each condition. The means of the obtained fold ratios were placed into the displayed graphs. The standard error of the mean (SEM) was calculated by T-test (2 tails) and used for setting error bars.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mélanie Laurin, Dr. Jean-François Côté, Mathieu Cotton, Dr. Audrey Claing and Dr. Nathalie Lamarche-Vane for reagents and advice for our work with GTPases. We are grateful to Tzu-Jen Kao and Dr. Artur Kania for kindly providing reagents and to Aude Daigneault for technical assistance. We also want to thank Luisa Izzi for sharing recent interesting data and Patricia Yam for elaboration of the neuron culture protocol. Our work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), the National Cancer Institute of Canada (NCIC) and the Canada Foundation for Innovation (CFI).

CHAPITRE II

REFERENCES

- ¹ Dickson, B. J., Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298 (5600), 1959 (2002).
- ² Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., and Tessier-Lavigne, M., Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78 (3), 425 (1994).
- ³ Fazeli, A. et al., Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386 (6627), 796 (1997).
- ⁴ Charron, F. et al., The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113 (1), 11 (2003).
- ⁵ Okada, A. et al., Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444 (7117), 369 (2006).
- ⁶ Patel, B. N. and Van Vactor, D. L., Axon guidance: the cytoplasmic tail. *Curr Opin Cell Biol* 14 (2), 221 (2002).
- ⁷ Meriane, M. et al., Phosphorylation of DCC by Fyn mediates Netrin-1 signaling in growth cone guidance. *J Cell Biol* 167 (4), 687 (2004).
- ⁸ Tong, J. et al., Netrin stimulates tyrosine phosphorylation of the UNC-5 family of netrin receptors and induces Shp2 binding to the RCM cytodomain. *J Biol Chem* 276 (44), 40917 (2001).
- ⁹ Palmer, A. et al., EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* 9 (4), 725 (2002).
- ¹⁰ Zisch, A. H., Kalo, M. S., Chong, L. D., and Pasquale, E. B., Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* 16 (20), 2657 (1998).
- ¹¹ Worley, T. and Holt, C., Inhibition of protein tyrosine kinases impairs axon extension in the embryonic optic tract. *J Neurosci* 16 (7), 2294 (1996).
- ¹² Robles, E., Woo, S., and Gomez, T. M., Src-dependent tyrosine phosphorylation at

CHAPITRE II

- the tips of growth cone filopodia promotes extension. *J Neurosci* 25 (33), 7669 (2005).
- ¹³ Knoll, B. and Drescher, U., Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* 24 (28), 6248 (2004).
- ¹⁴ Li, W. et al., Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci* 7 (11), 1213 (2004).
- ¹⁵ Ingley, E., Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* 1784 (1), 56 (2008).
- ¹⁶ Beggs, H. E., Soriano, P., and Maness, P. F., NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* 127 (3), 825 (1994).
- ¹⁷ Suetsugu, S. et al., Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell* 3 (5), 645 (2002).
- ¹⁸ Liu, G. et al., Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nat Neurosci* 7 (11), 1222 (2004).
- ¹⁹ Yam, P, Langlois, S., Morin, S., and Charron, F., Sonic hedgehog guides axons through a non-canonical, Src family kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* (2009 in press).
- ²⁰ Garrett, T. A., Van Buul, J. D., and Burridge, K., VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp Cell Res* 313 (15), 3285 (2007).
- ²¹ Miyamoto, Y., Yamauchi, J., and Itoh, H., Src kinase regulates the activation of a novel FGD-1-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor in the signaling pathway from the endothelin A receptor to JNK. *J Biol Chem* 278 (32), 29890 (2003).
- ²² Chang, J. H., Gill, S., Settleman, J., and Parsons, S. J., c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* 130 (2), 355 (1995).

CHAPITRE II

- 23 Mackay, D. J. and Hall, A., Rho GTPases. *J Biol Chem* 273 (33), 20685 (1998).
- 24 Nobes, C. D. and Hall, A., Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81 (1), 53 (1995).
- 25 Gallo, G. and Letourneau, P. C., Axon guidance: GTPases help axons reach their targets. *Curr Biol* 8 (3), R80 (1998).
- 26 Koh, C. G., Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neurosignals* 15 (5), 228 (2006).
- 27 Lewis, A., Di Ciano, C., Rotstein, O. D., and Kapus, A., Osmotic stress activates Rac and Cdc42 in neutrophils: role in hypertonicity-induced actin polymerization. *Am J Physiol Cell Physiol* 282 (2), C271 (2002).
- 28 Usui, I. et al., Cdc42 is a Rho GTPase family member that can mediate insulin signaling to glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 278 (16), 13765 (2003).
- 29 Hanke, J. H. et al., Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271 (2), 695 (1996).
- 30 Traxler, P. et al., Use of a pharmacophore model for the design of EGF-R tyrosine kinase inhibitors: 4-(phenylamino)pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *J Med Chem* 40 (22), 3601 (1997).
- 31 Chen, J. K. et al., Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (22), 14071 (2002).
- 32 Dickson, B. J., Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 11 (1), 103 (2001).
- 33 Kaufmann, N., Wills, Z. P., and Van Vactor, D., Drosophila Rac1 controls motor axon guidance. *Development* 125 (3), 453 (1998).
- 34 Brown, M. D., Cornejo, B. J., Kuhn, T. B., and Bamberg, J. R., Cdc42 stimulates

CHAPITRE II

- neurite outgrowth and formation of growth cone filopodia and lamellipodia. *J Neurobiol* 43 (4), 352 (2000).
- ³⁵ Roelink, H. et al., Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81 (3), 445 (1995).
- ³⁶ Wong, K. et al., Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107 (2), 209 (2001).
- ³⁷ Li, X. et al., Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci* 11 (1), 28 (2008).
- ³⁸ Briancon-Marjollet, A. et al., Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol* 28 (7), 2314 (2008).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Shh stimulation increases Cdc42 and Rac1 activity in cultured cell lines.

(A) Shh stimulation increases activation of endogenous Cdc42 and Rac1 in a dose-dependant manner. HEK293T cells were treated for 60 minutes with the indicated doses of Shh. Cells were lysed and GTP-loaded Rac1 and Cdc42 were pulled down using GST-Pak coupled to glutathione agarose beads. Endogenous levels of activated (pull-down) and total (input) Rac1 and Cdc42 were detected by immunoblot (IB). These results are representative of three independent experiments. GTP-bound forms of Rac1 and Cdc42 were quantified and compared to basal signal (non-stimulated). The results shown (fold/basal) are the mean \pm SEM of three independent experiments. * P < 0.05.

(B) Timecourse of Shh-induced activation of endogenous Cdc42 and Rac1 in HEK293T cells. Cells were treated with Shh for the indicated times and cell lysates were used in

CHAPITRE II

GST-Pak pull-down. Active forms of Rac1 and Cdc42 were quantified and compared to basal signal (non-stimulated). The results shown (fold/basal) are the mean between two independent experiments.

(C) Shh-treated COS7 cells (20 minutes, 5nM) also showed activation of endogenous Cdc42 and Rac1 as determined by GST-Pak pull-down. NaCl stimulation (10 minutes, 100mM final) is used as positive control to validate the increase of endogenous Rac1 and Cdc42 activation, since it was one of the positive controls able to induce GTPases activation in our assay (see figure S1B). GTP-bound Rac1 and Cdc42 were quantified and compared to basal signal (non-stimulated).

Figure 2. Shh stimulation activates Cdc42 and Rac1 in primary culture of commissural neurons.

(A) Shh stimulation (5nM) leads to the increase of the GTP-bound form of endogenous Cdc42 and Rac1 in primary culture of commissural axons isolated from stage E13.5 rat embryos. Cultured neurons were lysed after Shh stimulation and activated Rac1 and Cdc42 were pulled down with GST-Pak pull-down. GTP-bound forms of Rac1 and Cdc42 were quantified and compared to basal signal (non-stimulated). The results shown (fold/basal) are the mean \pm SEM of three independent experiments. * P < 0.05; ** P < 0.005.

Figure 3. The cytoplasmic tail of Boc is tyrosine-phosphorylated.

(A) Boc-GFP deletion mutants were generated, with a total removal of the cytoplasmic tail (Boc- Δ cyto-GFP), of the proximal half of cytoplasmic tail (Boc- Δ 1-GFP) or its distal half (Boc- Δ 2-GFP). A Boc-GFP point mutant was also generated, where the Y899 is replaced

CHAPITRE II

by a phenylalanine (Boc-Y899F-GFP).

(B) All Boc-GFP mutants show the same subcellular localization than wild-type Boc-GFP. In COS7 cells, GFP fluorescence from transfected Boc-GFP mutants was imaged using Leica DM-IRB inverted microscope. (Scale bar: 10 μ m)

(C) All Boc-GFP mutants are expressed and can be detected by immunoblot. Boc-WT-GFP, Boc- Δ 1-GFP, Boc- Δ 2-GFP or Boc-Y899F-GFP were transfected into COS7 cells. Lysates were used to probe for Boc-GFP expression, that was visualized by immunoblotting with a GFP antibody.

(D) A basal phospho-tyrosine signal, specific for Boc's cytoplasmic tail, is detected. Control-GFP (Ctl-GFP), Boc-WT-GFP and Boc Δ cyto-GFP plasmids were transfected into COS7 cells. After anti-GFP immunoprecipitation (IP), phospho-tyrosine levels of Boc-GFP were measured specifically by immunoblotting (IB) with an anti-phospho-tyrosine antibody. These results are representative of four independent experiments.

(E) The proximal domain of Boc's cytoplasmic tail carries the basal tyrosine phosphorylation. COS7 cells were transfected with the indicated Boc-GFP mutants plasmids. Cell lysates were subjected to anti-GFP immunoprecipitation and bound proteins were analyzed by immunoblot using phospho-tyrosine antibody. Phospho-tyrosine signals were quantified and compared to basal signal (non-stimulated). The results shown (fold/basal) are the mean between two independent experiments.

Figure 4. Shh stimulation increases tyrosine phosphorylation of Boc, in a SFK- and Smoothened-dependent manner.

(A) Tyrosine phosphorylation of Boc-GFP increases after Shh stimulation. Boc-GFP

CHAPITRE II

transfected COS7 cells were treated with Shh (5nM, 20 minutes). Lysates were subjected to anti-GFP immunoprecipitation and Boc-GFP tyrosine phosphorylation was analyzed by immunoblotting using a phospho-tyrosine antibody. These results are representative of three independent experiments. Phospho-tyrosine signals were quantified and compared to basal signal (non-stimulated). The results shown (fold/basal) are the mean \pm SEM of three independent experiments. ** P < 0.005.

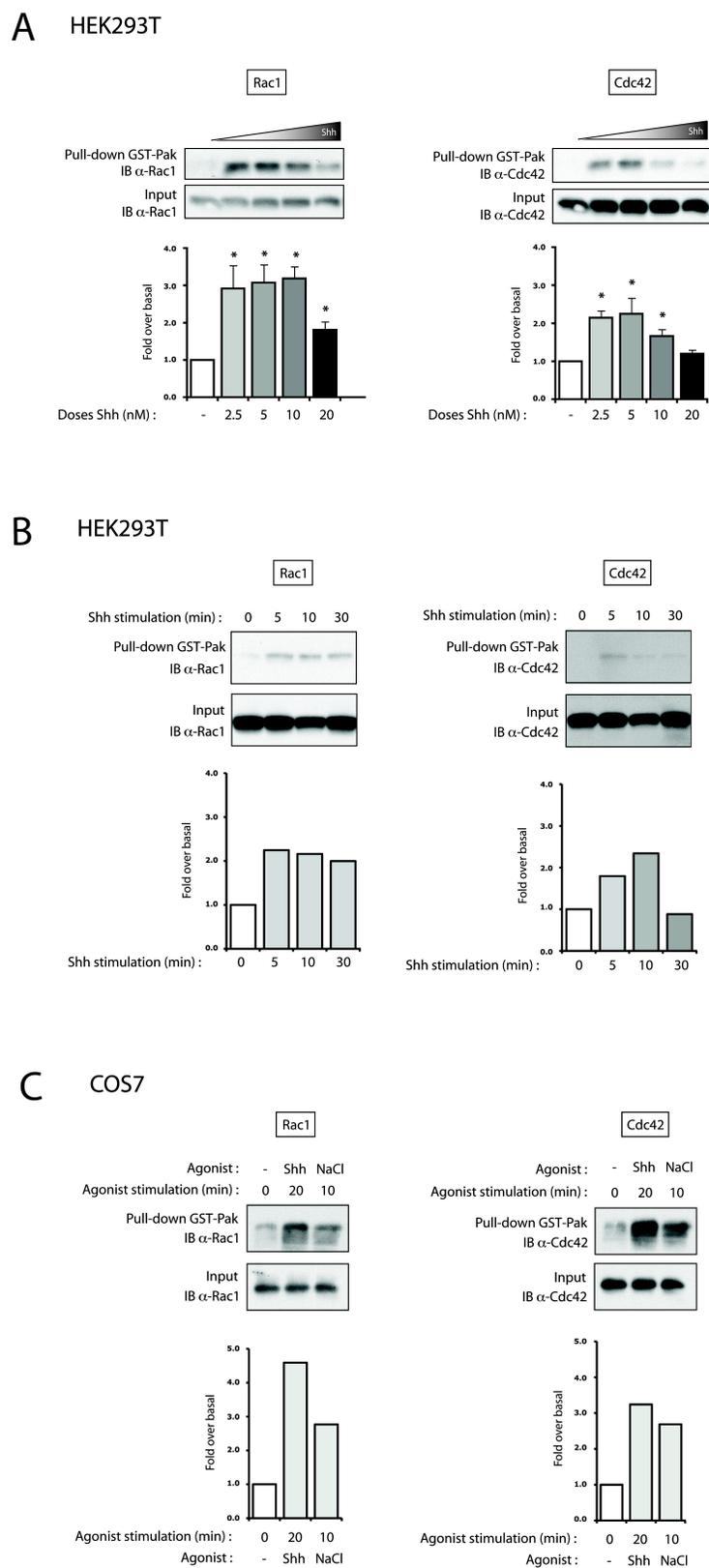
(B) Increase of phosphorylation is detected on Boc-GFP after Shh stimulation. COS7 cells were transfected with Boc-GFP. Cells were labelled with ^{32}P and stimulated with Shh for 20 minutes. An anti-GFP immunoprecipitation was performed on lysates and phosphate incorporation on Boc-GFP was detected from the ^{32}P signal. The ^{32}P signals were quantified and compared to basal signal (non-stimulated). The results shown (fold/basal) are the mean between two independent experiments.

(C) Shh-induced increase of tyrosine phosphorylation of Boc-GFP requires both Src-Family Kinases (SFK) and Smoothed (Smo) activities. COS7 cells transfected with Boc-GFP were stimulated with Shh (20 minutes, 5nM), in presence of the indicated antagonists, such as 400nM of SANT-1 (a specific Smo inhibitor), 200nM of PP2 (a SFK inhibitor) and 200nM of PP3 (a PP2 chemical analogue that does not inhibit SFKs). Cell lysates were used in immunoprecipitation against GFP-tagged Boc. Phospho-tyrosine signals were then quantified and compared to basal signal (non-stimulated).

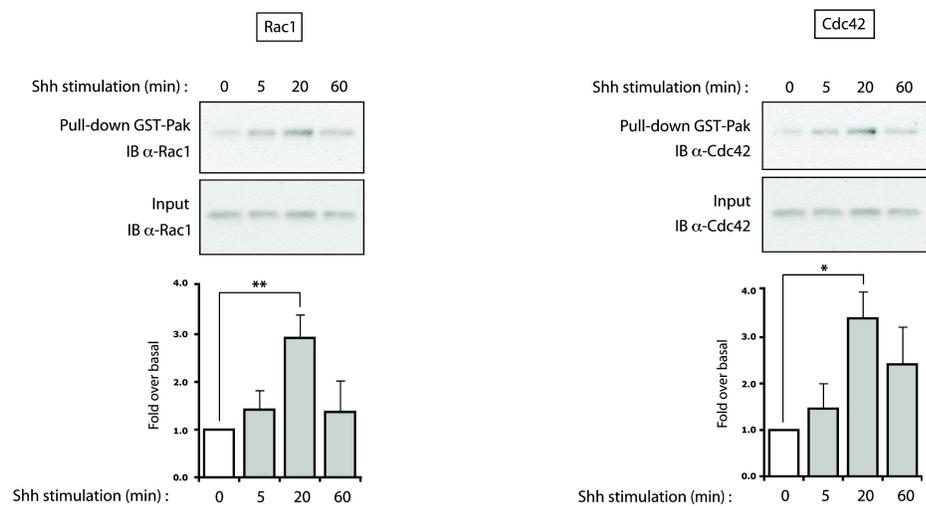
CHAPITRE II

FIGURES

Figure 1

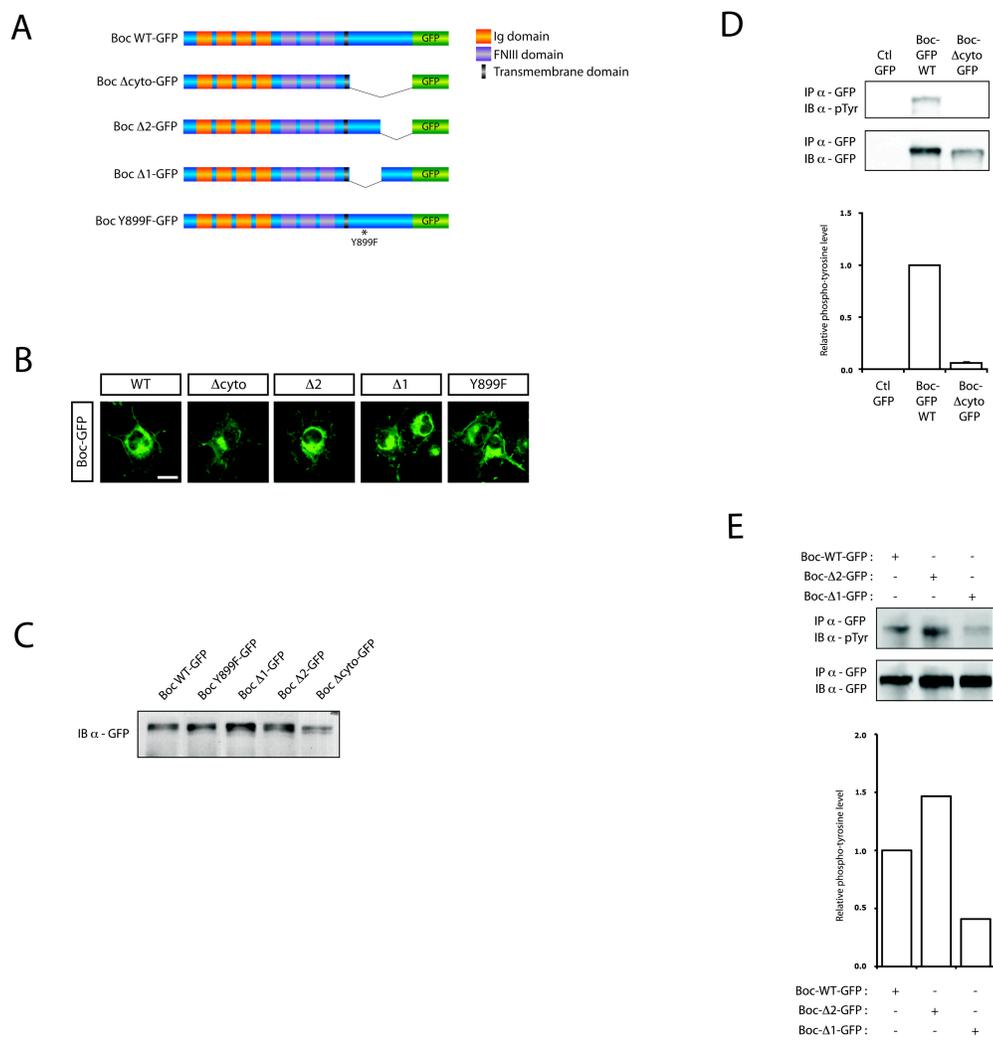


CHAPITRE II

Figure 2

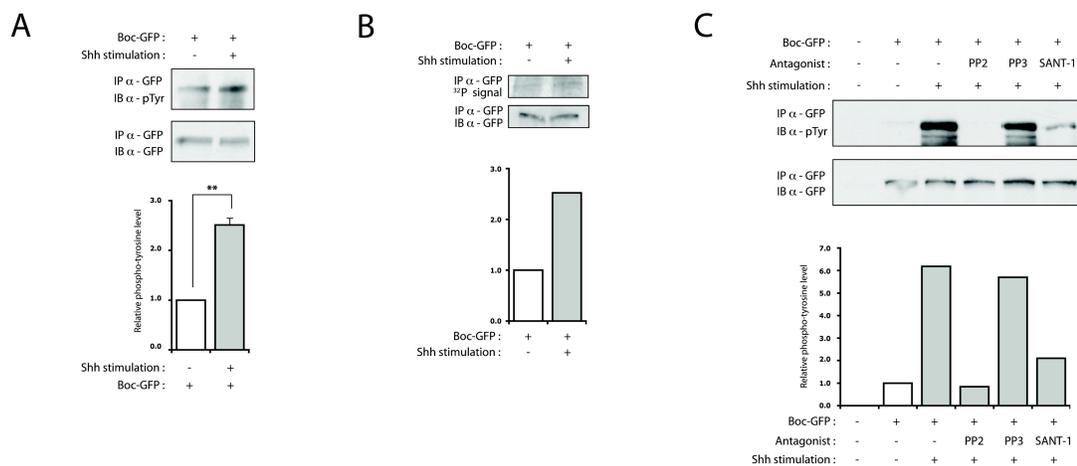
CHAPITRE II

Figure 3



CHAPITRE II

Figure 4



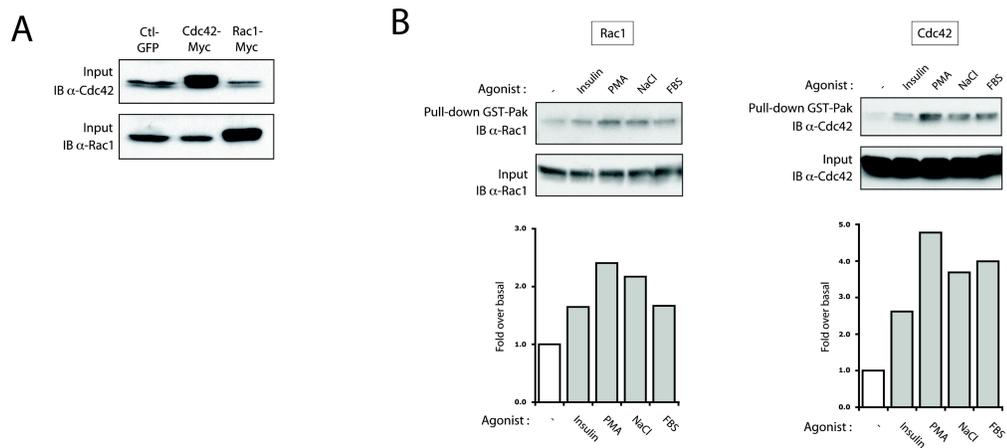
CHAPITRE II

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Figure S1. Endogenous GTPases activity can be measured using Rac1 and Cdc42 specific antibodies

(A) Cdc42 and Rac1 antibodies are specific for their respective target. COS7 cells were transfected with control-GFP (Ctl-GFP), Cdc42-Myc or Rac1-Myc. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblot (IB) using Cdc42 and Rac1 antibodies, showing both endogenous and overexpressed levels of GTPases.

(B) Endogenous Rac1 and Cdc42 activation can be measured efficiently by GST-Pak pull-down. Serum-starved HEK293T cells were treated with agonists reported to activate Cdc42 and/or Rac1, such as insulin (3 minutes, 100nM), PMA (10 minutes, 100nM), FBS (20 minutes, 10%) and to induce hypertonicity, NaCl (10 minutes, 100mM). Cleared cell lysates were used in GST-Pak pull-down. Endogenous levels of active (pull-down) and total (input) Rac1 and Cdc42 were analyzed by immunoblot. GTP-bound forms of Rac1 and Cdc42 were quantified and compared to basal signal (non-stimulated).

CHAPITRE II**SUPPLEMENTARY FIGURES****Figure S1**

CHAPITRE III :

DISCUSSION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

CHAPITRE III

1. RETOUR SUR LA DÉMONSTRATION DE L'EXISTENCE DE LA VOIE NON-CANONIQUE

Dans la littérature, plusieurs mécanismes très dissemblables ont été décrits comme relevant du fonctionnement *non-canonique* de la voie Hedgehog (Lauth and Toftgard, 2007; Shyamala and Bhat, 2002; Yam et al., 2009 in press). Notons cependant qu'il est généralement considéré que la définition première attribuée à la voie non-canonique est : « signalisation impliquant les composantes de la voie Hedgehog, mais qui est indépendante de la transcription médiée par les facteurs Gli » (Jenkins et al., 2009). Avant la démonstration de l'existence de la voie non-canonique, plusieurs phénomènes biologiques médiés par Shh étaient suspectés d'avoir recours à une telle activation non-classique, tels que le guidage axonal (Charron et al., 2003) et la migration cellulaire (Hochman et al., 2006) et nécessiteraient un remodelage rapide du cytosquelette indépendamment de la transcription. Des expériences utilisant une lignée cellulaire de fibroblastes murins ont indiqué un rôle pour Shh dans le contrôle de la morphologie cellulaire. Shh induit la formation de structures apparentées aux lamellipodes, concordant ainsi avec ses effets promigratoires décrits auparavant dans la littérature. La migration cellulaire induite par Shh se produirait en quelques minutes après l'ajout de Shh, tandis qu'une activité du rapporteur des facteurs Gli ne montre d'activité qu'après une stimulation de 6 heures (Bijlsma et al., 2007). Ces résultats s'additionnent aux premières expériences montrant un rôle de guidage pour Shh, où il était démontré que le cône de croissance de neurones de *Xenopus* réagit à la présence de Shh (Charron et al., 2003). Ces résultats, pointant vers une réaction rapide de la cellule en présence de Shh, furent également corroborés dans les neurones commissuraux. Le temps de réaction de l'axone envers un gradient de Shh fut d'ailleurs quantifié et s'avéra être de 8 minutes. Il fut aussi clairement déterminé que le guidage axonal se fait indépendamment de la transcription par les Gli, puisque ce phénomène n'est pas affecté par la présence d'inhibiteurs de transcription ou par l'expression d'un répresseur dominant des Gli ; venant ainsi clore le débat et prouver l'existence de la voie Shh non-canonique (Yam et al., 2009 in press).

CHAPITRE III

2. ANALYSE DES RÉSULTATS OBTENUS ET DES ACQUIS FOURNIS DANS LA LITTÉRATURE

Une analyse de la compréhension actuelle de la voie Shh non-canonique intervenant lors du guidage axonal sera faite à l'aide (1) des observations décrites précédemment dans le cadre de mon projet (voir chapitre II), (2) de données connues par communications personnelles avec les membres de notre groupe de recherche et (3) des informations disponibles dans la littérature. Un retour sera fait sur chaque acquis distinct contribuant à élucider le fonctionnement du guidage axonal médié par Shh.

2.1. Boc est un récepteur pour Shh

Le rôle de Boc dans la voie non-canonique est encore largement inconnu. Il a toutefois été démontré que sa présence est requise afin que Shh active la signalisation nécessaire au guidage axonal (Okada et al., 2006). Il s'agissait d'ailleurs du point de départ pour lancer mes travaux concernant l'étude de la signalisation induite par Boc lors du guidage par Shh. Entretemps, nous avons acquis l'information supplémentaire que Boc est en mesure de potentialiser la phosphorylation des SFK (Yam et al., 2009 in press). Cette observation n'implique pas forcément un rôle indépendant pour Boc, puisque Boc pourrait simplement médier une meilleure transmission du signal Shh vers Smo (en présentant efficacement Shh à Ptc). Smo étant requis pour l'activation des SFK, cette considération doit être retenue. Toutefois, un rôle pour Boc pourrait tout de même exister en parallèle, médiant ainsi une activation des SFK de concert avec Smo. Étant donné que d'autres récepteurs de molécules de guidage voient leur queue cytoplasmique modifiée en réponse au ligand (Li et al., 2004), il est permis de penser que, de la même façon, une activation de la signalisation Shh-dépendante ferait appel à une modification de la queue cytoplasmique de Boc.

2.2. La queue cytoplasmique de Boc est phosphorylée en tyrosine de façon basale

Les résultats démontrant que la queue cytoplasmique de Boc est phosphorylée en absence de Boc sont intéressants en eux-mêmes. Une phosphorylation basale peut permettre à Boc de séquestrer certaines molécules ou encore générer une conformation de sa queue cytoplasmique empêchant certaines interactions.

CHAPITRE III

2.2.1. Tyrosine(s) phosphorylée(s) de façon basale

Lors de mes expériences pour sonder la phosphorylation basale de Boc, il fut constaté que les délétions de portions de la queue cytoplasmique, (soit de la portion proximale ou de la portion distale), n'ont pas engendré une perte totale du signal phospho-tyrosine. On sait pourtant que le signal phospho-tyrosine est spécifique à la queue cytoplasmique, car aucune détection n'est observée chez le mutant Boc n'ayant plus de queue cytoplasmique. Ce résultat indique que chaque portion de la queue cytoplasmique porte un minimum d'une tyrosine phosphorylée.

Ensuite, il semblerait que la phosphorylation basale serait surtout présente sur une ou des tyrosine(s) de la partie proximale de la queue cytoplasmique, puisqu'il y a une chute de signal phospho-tyrosine associée à la troncation de cette portion. La portion proximale semble donc la plus pertinente dans l'étude d'une potentielle interaction basale dépendante d'une tyrosine phosphorylée.

Le résidu Y899 nous a particulièrement intéressés puisque cette tyrosine et les résidus qui l'entourent sont conservés entre Boc et Cdo. Bien que ces deux molécules soient très semblables au niveau extracellulaire, leur queue cytoplasmique est plus divergente. Une conservation de quelques résidus, impliquant une tyrosine de surcroît, a capté notre attention et nous a poussé à investiguer ce résidu en particulier. Toutefois, aucune baisse de la phosphorylation basale chez le mutant Y899F n'a été observée, soit parce que (1) ce résidu n'est pas phosphorylé au niveau basal ou (2) car plusieurs autres résidus sont phosphorylés constitutivement et rendent la perte de la phospho-tyrosine 899 impossible à détecter. La deuxième hypothèse concorderait avec la déduction que la queue cytoplasmique de Boc porte un minimum de deux tyrosines phosphorylées et potentiellement plus encore. Le doute subsiste donc concernant le rôle de la Y899 dans une régulation potentielle des interactions via une phosphorylation basale. En fait, les autres tyrosines du domaine proximal devraient chacune être mutées à leur tour afin d'avoir un regard complet sur la question.

Il n'en reste pas moins que la queue cytoplasmique de Boc est phosphorylée en tyrosine et qu'elle pourrait servir de point d'ancrage pour divers partenaires d'interaction.

CHAPITRE III

2.2.2. Interactions avec la queue cytoplasmique de Boc

Les interactions pour Boc décrites dans la littérature indiquent que cette protéine peut interagir avec elle-même (Kang et al., 2003), avec Shh (Okada et al., 2006; Yao et al., 2006), avec les cadhérines (Kang et al., 2003), avec sa protéine sœur Cdo (Kang et al., 2002) et peut-être avec la néogénine (un récepteur de la Nétrine) au sein d'un complexe impliquant Cdo (Kang et al., 2004). Shh est un ligand extracellulaire tandis que tous les autres partenaires sont des protéines transmembranaires qui semblent interagir avec Boc via leur domaine extracellulaire (Kang et al., 2003). Une interaction de Boc avec une molécule intracellulaire a cependant déjà été décrite, pour Bnip-2 qui est un facteur qui lierait aussi Cdo et Cdc42 (Kang et al., 2008).

Des expériences de notre groupe ont constaté d'autres interactions intéressantes avec des protéines liant Boc de façon basale.

2.2.2.1. Elmo1 (voir section 5.4.2.2 du chapitre I)

L'interaction entre Boc et la protéine Elmo1 fut testée dans le laboratoire du Dr. Jean-François Côté, puis reproduite par mon collègue Steves Morin. Il fut observé par co-immunoprécipitation qu'une interaction pour Boc et Elmo1 se produit de façon basale. Toutefois, en présence de Shh, Elmo1 se détache de la queue cytoplasmique de Boc. Une hypothèse concernant sa translocation serait qu'elle aille lier la GEF DOCK180, laquelle a été décrite pour former un complexe avec CrkII et Elmo pour activer Rac1 (Gumienny et al., 2001; Wu et al., 2001). Il fut effectivement détecté qu'après stimulation à Shh, il y a augmentation de l'interaction entre Elmo et DOCK180 (communication personnelle, Steves Morin). Cette interaction Boc/Elmo1 est ainsi très prometteuse, car elle viendrait relier Boc à une GEF pour Rac1. On pourrait penser à un mécanisme où Elmo1 est retenu à la queue cytoplasmique de Boc de façon basale, mais se détache en présence de Shh pour aller lier DOCK180 et activer Rac1.

Ce phénomène pourrait être dépendant de la phosphorylation de Boc. En identifiant plus spécifiquement les résidus impliqués à l'aide des mutants ponctuels, il serait possible d'identifier si la perte d'une ou plusieurs tyrosines viendrait invalider ce mécanisme de translocation d'Elmo1, de Boc vers DOCK180.

Cette hypothèse est d'autant plus intéressante qu'un article récent a proposé DOCK180 comme étant la GEF responsable de l'activation de Rac1 médiant l'attraction des neurones

CHAPITRE III

commissuraux par la Nétrine (Li et al., 2008). Toutefois, certaines nuances méritent d'être apportées face à ces résultats. Tout d'abord, les données obtenues dans cet article ont volontairement été exclues de l'introduction, car certains aspects nous paraissent discutables. Principalement, l'argument voulant que DOCK180 est exprimé dans les neurones commissuraux n'est aucunement corroboré par des expériences faites par notre groupe. À l'aide des contrôles adéquats, il est indéniable que DOCK180 n'est pas exprimé dans les neurones commissuraux *in vivo*, selon des expériences d'immunohistochimie faites par mon collègue Martin Lévesque. De plus, le messenger de DOCK180 n'est pas détecté par hybridation *in situ* pour dans les neurones commissuraux. Finalement, les mutants DOCK180 ne montrent pas de défauts de guidage des axones commissuraux.

Bien que DOCK180 ne soit pas la GEF impliquée dans le guidage des axones commissuraux, il est tout de même possible que le mécanisme via Boc/Elmo1 soit valide, mais qu'il ferait appel à un autre membre de la famille DOCK. En fait, Elmo1 peut lier les DOCK des groupes DOCK-A et -B, dont certains membres sont exprimés dans le tube neural. Un projet est actuellement en cours pour identifier les protéines DOCK qui seraient impliquées.

En parallèle, également dans les neurones commissuraux, une autre protéine GEF, dénommée Trio, a récemment été décrite pour transduire la réponse à la Nétrine via l'activation de Rac1. Il s'agirait d'un médiateur requis pour la croissance et le guidage induits par la Nétrine. En sachant que cette GEF est exprimée aux bons temps et endroit, et qu'elle régule des phénomènes de guidage chimioattractifs, il faut rester à l'affût et envisager que cette GEF pourrait aussi jouer un rôle dans d'autres mécanismes de guidage des axones commissuraux, incluant ceux médiés par Shh (Briancon-Marjollet et al., 2008).

2.2.2.2. L'ubiquitine

Afin d'investiguer les modifications subies par la queue cytoplasmique de Boc, une expérience de spectrométrie de masse a été réalisée. Boc-GFP fut transfecté dans des cellules en culture, puis immunoprécipité et migré sur gel de SDS-PAGE, pour ensuite être envoyé pour analyses par spectrométrie de masse. Plusieurs interactions ont été notées, mais les scores de fiabilité ont souvent indiqué que certains résultats auraient avantage à être reproduits avant que l'on puisse se prononcer sur une interaction. Toutefois, une protéine s'est démarquée du lot, ayant un haut score de fiabilité : l'ubiquitine.

CHAPITRE III

Les ajouts d'ubiquitine sont très fréquents dans la cellule et serviraient principalement à médier la dégradation protéasome-dépendant des protéines ciblées. Dans le cas de Boc, ce contrôle potentiel de l'accumulation pourrait se faire au niveau basal ou de façon Shh-dépendante. Notons qu'il a récemment été décrit que Shh régule la dégradation de SuFu via la voie classique ubiquitination/protéasome (Yue et al., 2009). Concernant Boc, un mécanisme de dégradation médié par l'ubiquitine serait soutenu par certaines de mes expériences. Il fut observé à plusieurs reprises qu'une stimulation à long terme de Shh (plus de 8 heures) induit une baisse des niveaux de Boc. Cette tendance n'a pas été quantifiée, mais semble indiquer une action de régulation des niveaux de Boc induite par Shh ; impliquant cependant des temps de réaction beaucoup plus long que ceux qui nous intéressent pour l'étude du guidage axonal.

Cependant, l'ubiquitination n'est pas uniquement associée à la dégradation de la protéine ciblée : une mono-ubiquitination peut être un signal médiant l'endocytose d'un récepteur (Bourikas et al., 2005). Les β -arrestines fonctionneraient comme adaptateurs lors de ce processus ; en effet, ces protéines peuvent interagir avec certains récepteurs ubiquitinés et recruter la machinerie nécessaire à l'endocytose de ce dernier (Mittal and McMahon, 2009). L'hypothèse que Boc pourrait être endocytosé via une ubiquitination est attrayante, spécialement lorsqu'on tient compte de deux points. Premièrement, la régulation de l'endocytose des composantes de la voie Shh est un moyen déjà connu pour gérer l'activation de la signalisation. Par exemple, Smo activé sera endocytosé via l'action de la β -arrestine (Chen et al., 2004b). Et deuxièmement, en plus de montrer une interaction avec l'ubiquitine, Boc peut lier la β -arrestine.

2.2.2.3. β -arrestines (voir section 3.4.5. du chapitre I)

Une interaction entre Boc et les β -arrestines a été observée par co-immunoprécipitation par ma collègue Luisa Izzi. La β -arrestine 2 est spécialement intéressante de par sa capacité à lier Smo en présence de Shh (Chen et al., 2004b; Meloni et al., 2006). L'activation de la β -arrestine 2 médie la transduction de la voie canonique telle que décrite lors de l'introduction. De plus, les β -arrestines sont également capables de recruter les SFK (Luttrell et al., 1999), qui sont les seules composantes identifiées pour la voie Shh non-canonique. Les β -arrestines pourraient ainsi constituer le premier point où la signalisation induite par Shh peut bifurquer. Les β -arrestines auraient les caractéristiques attendues pour

CHAPITRE III

remplir ce rôle, car elles sont capables (1) d'être activées par un signal Shh et (2) d'induire une activation des voie canonique et non-canonique.

Dans un contexte de voie canonique, l'interaction entre les β -arrestines et Boc viendrait expliquer la potentialisation de la réponse transcriptionnelle induite par Boc, en dehors de la théorie de présentation de Shh à Ptc. Dans un contexte de voie Shh non-canonique, la capacité des β -arrestines de lier à la fois Smo et Boc viendrait expliquer pourquoi l'activation des SFK est modulée par ces deux protéines à la fois. De surcroît, un rôle des β -arrestines contribuerait à expliquer comment Boc et Smo pourraient toutes deux être requises pour le guidage axonal (voir figure 9). Finalement, il faut noter que les β -arrestines ont été décrites pour leur capacité à recruter des protéines vers certains récepteurs, des facteurs tels que les SFK par exemple (Luttrell et al., 1999).

2.2.2.4. Fyn, une kinase de la famille Src (voir section 6.1.1. du chapitre I)

Fyn est une des kinases de la famille Src (SFK) et est exprimée dans les neurones commissuraux (Yam et al., 2009 in press). Une interaction entre cette kinase et Boc a été découverte via des expériences de co-immunoprécipitation faites par Luisa Izzi au sein de notre équipe. Src possède un domaine SH3 et un domaine SH2, pouvant médier diverses interactions avec des substrats et régulateurs. Le domaine SH3 vient lier un motif riche en proline, ayant pour séquence consensus PPXP. Sur la queue cytoplasmique de Boc, la séquence la plus similaire contient les résidus TPPPT et est située complètement au bout de la queue cytoplasmique (sur la portion distale) ; un tel motif n'est pas consensuel et n'est donc pas envisagé a priori pour expliquer l'interaction Boc/Fyn. Toutefois, étant donné que les domaines SH2 lient les tyrosines phosphorylées, ce domaine de Fyn devient fort intéressant pour un interaction avec Boc. En effet, la démonstration de la présence d'au moins deux résidus phospho-tyrosine sur la queue cytoplasmique de Boc est totalement compatible avec une interaction de Boc et Fyn, via le domaine SH2 de cette dernière. Bien que les SFK lient en général les tyrosines phosphorylées via leur domaine SH2, ils montrent leur affinité la plus haute pour la séquence consensus pYEEI (Ingle, 2008), qui n'est pas présente (de près ou de loin) sur la queue de Boc. Malgré tout, cette interaction semble significative, spécialement lorsque mise en contexte avec la transduction de la voie Shh non-canonique.

CHAPITRE III

2.3 Boc est phosphorylé après stimulation à Shh

Aucune modification de Boc après une stimulation à Shh n'avait encore été décrite. Nous avons été les premiers à observer une augmentation de la phosphorylation en tyrosine sur la queue cytoplasmique de Boc. Ces résultats furent cependant obtenus en lignée cellulaire ; cette augmentation de la phosphorylation pourrait donc être circonstancielle et ne pas être liée au guidage axonal dans les neurones commissuraux (voir aussi section 3.1 du présent chapitre). Toutefois, il faut rappeler que dans les neurones, Boc potentialise l'activation des SFK, lesquelles sont requises pour le guidage axonal (Yam et al., 2009 in press). D'ailleurs, il a été démontré que Boc est requis pour le guidage, puisque l'attraction Shh-dépendante des neurones commissuraux est perdue lorsque ceux-ci sont électroporés avec des siRNA contre Boc (Okada et al., 2006). Quelques expériences pour mesurer la phosphorylation de Boc endogène dans les neurones (après stimulation à Shh) furent tentées étant donné qu'une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-Boc était possible. Cependant, les niveaux de Boc (même après immunoprécipitation) n'étaient pas suffisants pour mesurer une hausse de phosphorylation et auraient nécessité une quantité d'embryons impossible à obtenir de façon pratique. L'étude de la hausse de phosphorylation de Boc à l'aide des cellules COS7 s'avérait donc être un modèle plus accessible.

Ainsi en tenant compte (1) que Boc est requis pour le guidage des axones commissuraux et (2) que Boc montre une hausse de phosphorylation Shh-dépendante, cela suggère qu'un mécanisme de transduction via la phosphorylation de la queue cytoplasmique de Boc pourrait avoir lieu lors du guidage axonal des neurones commissuraux. La caractérisation de cette phosphorylation induite par Shh aurait d'ailleurs pu être testée à l'aide des mutants de délétion Boc. De plus, bien qu'une mutation de la tyrosine Y899 n'induit pas une perte de phosphorylation basale, celle-ci pourrait être impliquée dans la hausse de phosphorylation Shh-dépendante du récepteur Boc. Des expériences avec le mutant Y899F (après stimulation à Shh) pourraient ainsi venir valider cette hypothèse.

La phosphorylation d'un récepteur est un type de régulation courant, qui fut été décrit dans plusieurs systèmes de guidage, impliquant fréquemment les SFK.

CHAPITRE III

2.4. Les SFK sont requises pour la phosphorylation de Boc et pour le guidage

Les SFK ont été décrites pour phosphoryler la queue cytoplasmique de récepteurs de guidage après que ceux-ci aient lié leur ligand. Le cas de DCC, un récepteur de la Nétrine montrant une structure très semblable à Boc, est particulièrement intéressant. En présence de Nétrine, il y a augmentation de la phosphorylation en tyrosine sur la queue cytoplasmique du récepteur de façon SFK-dépendante. Dans un cas, la kinase impliquée serait Src ; il fut décrit qu'elle interagit avec DCC de façon basale et que cette interaction est accrue en présence de Nétrine (Li et al., 2004). Un autre groupe a également démontré que DCC est phosphorylé par une SFK, à la différence près qu'il s'agirait plutôt de Fyn. Il fut aussi décrit que l'inhibition des SFK empêche le virage du cône de croissance en direction de la source de Nétrine. De plus, une tyrosine spécifique sur la queue cytoplasmique de DCC fut associée à l'effet de croissance induit à la Nétrine (Meriane et al., 2004).

Il est possible d'établir un parallèle dans le contexte du guidage médié par Shh et par la Nétrine. En effet, nous sommes également en présence d'une hausse de phosphorylation du récepteur induite par le ligand, ainsi que d'une SFK (Fyn) capable de lier la queue cytoplasmique du récepteur. De plus, une activation de Shh induit l'activation des SFK, activation qui peut d'ailleurs être potentialisée par la présence de Boc. Mis ensemble, ces éléments expliqueraient que les SFK soient requises pour la phosphorylation de Boc, puisqu'il pourrait s'agir de la kinase responsable de cet effet. De plus, le lien entre la phosphorylation de Boc et les SFK contribuerait à expliquer pourquoi Boc et les SFK toutes deux requises pour le guidage : il en serait ainsi car elles participeraient au sein du même complexe pour transduire le signal Shh.

En plus de leur capacité à phosphoryler les récepteurs de guidage, il faut également tenir en compte que les SFK possèdent une panoplie d'autres substrats. Du moins, la gamme impressionnante de substrats déjà identifiés indique que les SFK activées seraient en mesure d'influencer directement certains régulateurs du cytosquelette. Shh pourrait donc médier son action sur le cône de croissance via l'activation des SFK. De plus, en tenant compte du fait qu'une SFK lie le récepteur Boc, on peut proposer l'hypothèse que la reconnaissance de Shh par Boc induit une activation locale des SFK qui viendrait stimuler la polymérisation d'actine sur le site de détection. En fait, cette hypothèse serait supportée

CHAPITRE III

par des expériences faites avec des neurones commissuraux soumis à un gradient stable de Shh. Ceux-ci montrent une plus grande proportion de SFK activées distribuées du côté du cône de croissance faisant face au gradient de Shh (Yam et al., 2009 in press).

Plus particulièrement, il faut rappeler qu'un des substrats de Src est p130^{CAS}, qui est décrite pour pouvoir recruter le complexe CrkII/DOCK180/Elmo1 (Huveneers and Danen, 2009). En considérant la régulation Shh-dépendante du complexe DOCK/Elmo via la queue cytoplasmique de Boc, il est permis d'envisager un lien entre l'activation des SFK et le contrôle du cytosquelette via les GEF de la famille DOCK.

Finalement, il faut souligner que l'activation des SFK est dépendante de Smo (Yam et al., 2009 in press). Cette dernière viendrait ainsi induire ses effets sur le guidage en passant par l'action des SFK, expliquant ainsi que Smo soit un effecteur essentiel à la voie non-canonique.

2.5. Smo est requis pour la phosphorylation de Boc et pour le guidage

Smo est la seule composante ayant été clairement démontrée pour être absolument requise à la fois pour le guidage axonal (Charron et al., 2003) et pour les effets de transcription par les facteurs Gli (Murone et al., 1999). En addition de l'activation Smo-dépendante des SFK par Shh (Yam et al., 2009 in press), il fut observé que Smo est requis pour l'augmentation de la phosphorylation de la queue cytoplasmique de Boc. L'amas grandissant de données pointe vers une activation séquentielle Shh→Smo→SFK→phosphorylation de Boc (voir figure 9). Toutefois, étant donné que Boc potentialise l'activation de SFK, il pourrait plutôt y avoir une collaboration entre les SFK et Boc pour leur activation mutuelle. Il n'en reste pas moins que Smo contrôle la phosphorylation induite de Boc et l'activité des SFK, expliquant qu'il soit requis pour la transduction de la voie non-canonique.

2.6. Shh induit une activation rapide des petites GTPases Cdc42 et Rac1

Ultimement, l'intégration des signaux de transduction induits par Shh génère un remodelage consensuel du cytosquelette pour engendrer une attraction du cône de croissance. Le lien manquant entre ce constat et les événements de signalisation décrits plus haut pourrait être contenu en partie dans l'activation des petites GTPases Rho.

CHAPITRE III

Dans l'étude de la chimioattraction par Shh, nous avons étudié l'activation de Cdc42 et Rac. Sonder l'activité de RhoA aurait également été pertinent compte tenu de sa capacité à influencer le cytosquelette. De plus, RhoA a été impliqué, avec une protéine G, dans un mécanisme Smo-dépendant responsable de l'activation transcriptionnelle de la voie Shh ainsi que de la croissance de neurites. RhoA pourrait donc potentiellement constituer un point de bifurcation des voies Shh canonique et non-canonique, comme pourrait l'être Smo (Kasai et al., 2004).

Néanmoins, les rôles typiques de Cdc42 et Rac1, promouvant le cytosquelette, étaient compatibles avec l'attraction médiée par Shh que nous voulions étudier. Il fut observé pour la première fois que Shh active les GTPases Rac1 et Cdc42 dans les neurones commissuraux. En faisant le lien entre le remodelage du cytosquelette et Shh, ces résultats solidifient la place de la voie Shh non-canonique lors du guidage, puisque l'activation des GTPases se fait en des temps beaucoup plus courts que ceux requis par la machinerie transcriptionnelle. Le lien immédiat entre l'activation des GTPases, les événements d'activation des SFK et la phosphorylation de Boc doit cependant être investigué davantage, afin de connecter la voie Shh non-canonique, à partir du ligand jusqu'aux acteurs responsables du remodelage du cytosquelette. L'importance des rôles de SFK et de Smo pourrait être davantage investigué à l'aide d'inhibiteurs spécifiques pour ces facteurs. Pour l'activation de Rac1, on peut spéculer sur un rôle du complexe DOCK/Elmo. Concernant Cdc42, l'activation de celle-ci pourrait être médiée directement par certaines GEF contrôlées par les SFK (Miyamoto et al., 2003).

Afin que soient ultimement reliés les événements de phosphorylation de Boc et d'activation des GTPases (tous deux induits par Shh), il aurait été intéressant de tester si la phosphorylation de Boc est requise et/ou suffisante pour l'activation des GTPases. L'activation des GTPases par Shh peut être mesurée au sein de cellules transfectées avec le récepteur Boc pour vérifier si Boc est suffisant pour potentialiser l'activation de celles-ci. Cette expérience a été réalisée (données non-montrées) et a semblé indiquer que la surexpression de Boc potentialise l'activation des GTPases induite par Shh. Ce lien entre Boc et les GTPases est pertinent, mais ces expériences étaient sujettes à différentes variations expérimentales, potentiellement dues aux niveaux d'expression de Boc pouvant faiblement varier et à la grande sensibilité du système de mesure de l'activité des GTPases.

CHAPITRE III

Afin de tester si Boc est requis pour l'activation Shh-dépendante des GTPases, des expériences du même type pourraient être faites, à l'aide de cellules transfectées avec des ARN silenceurs pour Boc. Les mutants ponctuels ou de délétion peuvent aussi être transfectés pour tester s'ils peuvent potentialiser l'activation GTPases par Shh. Certains de ces mutants pourraient aussi se comporter en mutants dominant négatif et empêcher le signal Shh d'être transduit, en liant le ligand sans activer la signalisation nécessaire.

3. RÉCONCILIATION DES CONCEPTS ABORDÉS

3.1. Justifications des modèles cellulaires utilisés

L'étude des mécanismes régissant les petites GTPases Rho impliquait un certain défi technique, puisqu'il fallait détecter une activation endogène de petites GTPases dans une culture de neurones embryonnaires. Certes, les neurones embryonnaires peuvent être cultivés et utilisés en biochimie, mais la dissection des embryons requiert du temps et une certaine habileté de dissection. De plus, le matériel cellulaire pouvant être utilisé est limitant puisqu'une portée complète d'embryons génère de l'ordre de 5 millions de cellules une fois mises en culture. Il faut aussi garder en tête que les neurones en culture, contrairement à d'autres types de cultures primaires, ne se divisent pas et ne peuvent donc pas être soumis à des passages cellulaires *in vitro* dans le but de les amplifier et les congeler. En plus du nombre de cellules, le matériel cellulaire (utilisable pour les études biochimiques) est encore davantage limitant dû au fait que les neurones possèdent une morphologie particulière, avec un petit corps cellulaire et un long axone, et ne peuvent êtreensemencées en confluence très élevée. De surcroît, il faut garder en tête que l'activation des GTPases peut potentiellement se faire seulement au sein du cône de croissance, qui représente une minorité de la proportion du matériel cellulaire d'un lysat de culture de neurones. Mis ensemble, tous ces éléments nous obligeaient à tout d'abord observer l'activation des GTPases dans un autre modèle cellulaire et optimiser les conditions d'activation, avant de travailler avec les cultures de neurones ; particulièrement si l'on considère notre position initiale où l'activation de Rac1 ou Cdc42 induite par Shh n'avait encore jamais été observée ou publiée.

CHAPITRE III

Nous avons ainsi opté pour mesurer l'activation de Rac1 et Cdc42 dans les cellules COS7 et HEK293, qui étaient disponibles au laboratoire et s'étaient avérées être d'excellents outils pour d'autres expériences au laboratoire. Les cellules « CV-1 in Origin and carrying SV40 genetic material - 7 » (COS7) sont dérivées de cellules de rein de singe immortalisées (Gluzman, 1981), tandis que les cellules « Human Embryonic Kidney - 293 » (HEK293) ont été générées par transformation de cultures de cellules rénales humaines embryonnaires (Graham et al., 1977). Bien que les cellules HEK293 soient généralement considérées comme dérivant de fibroblastes rénaux, il semblerait que cette lignée comporte davantage de propriétés appartenant aux cellules neuronales. Ceci serait potentiellement dû à la transformation initiale de cellules de lignage neuronal présentes au sein de la culture originale de tissu de rein (Shaw et al., 2002).

De par diverses expériences réalisées au laboratoire, nous avons observé que les cellules COS7 expriment certaines composantes de la voie Shh, telles que Boc et Smo, quoique plutôt faiblement (communication personnelle - Steves Morin). L'expression de ces acteurs de la voie Shh dans les COS7 nous permet donc de supposer que la propagation du signal Shh pourrait être conservée chez ces cellules, du moins au niveau de la régulation des protéines membranaires. Les cellules COS7 constituent donc un outil permettant l'obtention plus aisée de résultats pertinents pour étudier la voie de signalisation Shh. Ces cellules furent d'ailleurs utilisées dans cette optique quand nous avons voulu étudier la phosphorylation de Boc induite par Shh. L'électroporation du récepteur Boc aurait pu être faite dans les neurones et ceux-ci être stimulés avec Shh, mais la faible quantité de matériel obtenu avec les neurones, additionné au taux d'électroporation moins grand que les taux de transfection des COS7, augurait de grandes difficultés techniques. Ainsi, l'obtention de résultats au sein des COS7 reste un excellent indicateur d'un effet Shh-dépendant sur le récepteur Boc.

Quant aux cellules HEK293, l'absence d'expression détectable de Smo au sein des HEK293 a été notée par certains groupes (Meloni et al., 2006). Paradoxalement, ce type cellulaire a tout de même été utilisé pour l'étude des mécanismes moléculaires régissant la voie Shh (Chen et al., 2004b). Il semblerait que le signal Shh est transduit jusqu'aux facteurs Gli de façon normale, si Smo est exprimé de façon exogène (Meloni et al., 2006). Les cellules HEK293 constituent ainsi un outil différent des COS7, puisqu'elles pourraient

CHAPITRE III

permettre de vérifier si le signal Shh requiert ou non la protéine Smo. Étant donné que nous avons observé une activation Shh-dépendante des GTPases dans les HEK293, nous pouvons poser l'hypothèse que le signal Shh ne requière pas Smo ; quoique cela serait cependant surprenant, considérant que Smo est requis pour le guidage axonal (voie non-canonique). Une seconde hypothèse serait plutôt que les HEK293 expriment des niveaux extrêmement faibles de Smo, mais que ces niveaux suffisent à la transduction du signal Shh vers les GTPases. Cette deuxième hypothèse ne concorderait toutefois pas avec les données (non-montrées) par Meloni *et al.* concernant le transduction de la voie classique, mais n'est pas forcément incompatible avec les mécanismes régissant la transduction de la voie non-canonique. Finalement, il se pourrait que les deux hypothèses soient valides dépendant de la lignée HEK293 utilisée : les lignées établies changent et mutent au rythme des passages cellulaires, en plus de ne pas forcément être exactement les mêmes utilisées par différents groupes. Il est ainsi possible que les cellules HEK293 utilisées par Meloni *et al.* ne produisent pas d'effecteur Smo endogène, tandis que les HEK293 que nous cultivons au laboratoire expriment encore faiblement Smo. Les expériences d'activation des GTPases par Shh en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de Smo (proposées à la section 2.6) pourraient venir conclure le débat sur le sujet.

3.2. Résumé de la compréhension actuelle du modèle proposé

Les acteurs et les mécanismes impliqués dans la transduction de la voie Shh non-canonique commencent à faire surface. Afin que se fasse correctement le guidage axonal, les protéines Smo, Boc et SFK sont requises. En présence de Shh, Boc et les SFK agiraient potentiellement l'une sur l'autre : les SFK en phosphorylant Boc, et Boc en potentialisant l'action des SFK de concert avec une activation via Smo. Smo est d'ailleurs requis non seulement pour l'activation des SFK, mais aussi pour la hausse de phosphorylation de Boc. L'action de Shh vient également activer les petites GTPases Rac1 et Cdc42. L'activité de celles-ci constitue le point de contrôle du remodelage du cytosquelette et fut démontrée pour être régulée par Shh dans les neurones commissuraux en développement. Le contrôle de l'activité de Rac1 et Cdc42 pourrait faire appel au complexe DOCK/Elmo ou à l'action de substrats des SFK. Ces mécanismes d'activation de Rac1 et Cdc42 restent encore à être identifiés afin que soit connectée entièrement la signalisation induite par Shh, à partir du

CHAPITRE III

ligand jusqu'aux petites GTPases Rho contrôlant le remodelage d'actine requis pour réorienter le cône de croissance lors du guidage axonal.

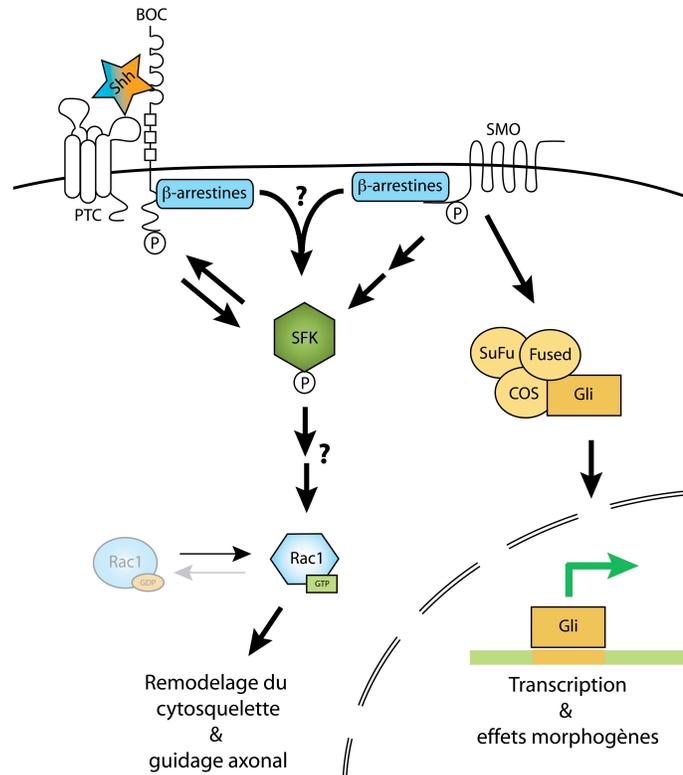


Figure 9. Schéma décrivant ce qui est connu de la transduction de la voie Shh non-canonique. En présence de Shh, il y a activation de Smo, qui est requis à la fois pour les événements transcriptionnels et pour le guidage axonal. Il y a également activation de SFK, qui voit son activité affectée par Smo et Boc. Après stimulation à Shh, une hausse de phosphorylation en tyrosine de Boc Smo- et SFK-dépendante est détectée. Le rôle des β-arrestines est encore inconnu, mais elles seraient en mesure de lier les protéines Smo et Boc. Finalement, il fut également détecté que les petites GTPases Rac1 et Cdc42 sont activées sous l'effet de Shh.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., and Walter, P. (2002a). *Molecular Biology of the Cell* (Part of chapter 16: "The self-assembly and dynamic structure of cytoskeletal filaments"), Fourth edition edn (New York, Garland Science).
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., and Walter, P. (2002b). *Molecular Biology of the Cell* (Part of chapter 16: "The Cytoskeleton and Cell Behaviour") (New York, Garland Science).
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., and Walter, P. (2002c). *Molecular Biology of the Cell* (Part of chapter 21: "Neural Development"), Fourth edition edn (New York, Garland Science).
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., and Hooper, J.E. (1996). The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* *86*, 221-232.
- Alexandre, C., Jacinto, A., and Ingham, P.W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev* *10*, 2003-2013.
- Allen, B.L., Tenzen, T., and McMahon, A.P. (2007). The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev* *21*, 1244-1257.
- Alt, K.W., Jeunesse, C., Buitrago-Tellez, C.H., Wachter, R., Boes, E., and Pichler, S.L. (1997). Evidence for stone age cranial surgery. *Nature* *387*, 360.
- Aoki, K., Nakamura, T., and Matsuda, M. (2004). Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* *279*, 713-719.
- Apionishev, S., Katanayeva, N.M., Marks, S.A., Kalderon, D., and Tomlinson, A. (2005). *Drosophila* Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nat Cell Biol* *7*, 86-92.
- Arthur, W.T., and Burridge, K. (2001). RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell* *12*, 2711-2720.
- Arthur, W.T., Petch, L.A., and Burridge, K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* *10*, 719-722.
- Atkinson, P.J., Dellovade, T., Albers, D., Von Schack, D., Saraf, K., Needle, E., Reinhart, P.H., and Hirst, W.D. (2009). Sonic Hedgehog signaling in astrocytes is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase and G-protein receptor kinase 2. *J Neurochem* *108*, 1539-1549.
- Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* *267*, 17882-17890.
- Augsburger, A., Schuchardt, A., Hoskins, S., Dodd, J., and Butler, S. (1999). BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* *24*, 127-141.
- Aza-Blanc, P., and Kornberg, T.B. (1999). Ci: a complex transducer of the hedgehog signal. *Trends Genet* *15*, 458-462.
- Basch, M.L., Garcia-Castro, M.I., and Bronner-Fraser, M. (2004). Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth Defects Res C Embryo Today* *72*, 109-123.
- Bear, M.F., Connors, B.W., and Paradiso, M.A. (2002). *Neurosciences: À la découverte du cerveau* (Baltimore, Éditions Pradel).
- Beckett, K., Franch-Marro, X., and Vincent, J.P. (2008). Glypican-mediated endocytosis of Hedgehog has opposite effects in flies and mice. *Trends Cell Biol* *18*, 360-363.
- Beggs, H.E., Soriano, P., and Maness, P.F. (1994). NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* *127*, 825-833.
- Bijlsma, M.F., Borensztajn, K.S., Roelink, H., Peppelenbosch, M.P., and Spek, C.A. (2007). Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cell Signal* *19*, 2596-2604.
- Bijlsma, M.F., Spek, C.A., Zivkovic, D., van de Water, S., Rezaee, F., and Peppelenbosch, M.P. (2006). Repression of smoothed by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol* *4*, e232.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* *348 Pt 2*, 241-255.
- Boggon, T.J., and Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* *23*, 7918-7927.

RÉFÉRENCES

- Bompard, G., Sharp, S.J., Freiss, G., and Machesky, L.M. (2005). Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by MIM-B. *J Cell Sci* 118, 5393-5403.
- Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardo, M., and Stoeckli, E.T. (2005). Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* 8, 297-304.
- Briancon-Marjollet, A., Ghogha, A., Nawabi, H., Triki, I., Auziol, C., Fromont, S., Piche, C., Enslin, H., Chebli, K., Cloutier, J.F., *et al.* (2008). Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol* 28, 2314-2323.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T.M., and Struhl, G. (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7, 1279-1291.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.
- Brouns, M.R., Matheson, S.F., and Settleman, J. (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol* 3, 361-367.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R., and Ravichandran, K.S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4, 574-582.
- Callahan, C.A., Ofstad, T., Horng, L., Wang, J.K., Zhen, H.H., Coulombe, P.A., and Oro, A.E. (2004). MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes Dev* 18, 2724-2729.
- Callejo, A., Culi, J., and Guerrero, I. (2008). Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 912-917.
- Capurro, M.I., Xu, P., Shi, W., Li, F., Jia, A., and Filmus, J. (2008). Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell* 14, 700-711.
- Carpenter, D., Stone, D.M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A., and de Sauvage, F.J. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13630-13634.
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., *et al.* (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228-231.
- Carter, N., Nakamoto, T., Hirai, H., and Hunter, T. (2002). EphrinA1-induced cytoskeletal re-organization requires FAK and p130(cas). *Nat Cell Biol* 4, 565-573.
- Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., and Rougon, G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27, 237-249.
- Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S., and Rougon, G. (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J* 21, 6348-6357.
- Cattoir, V. (2004). [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris)* 52, 607-616.
- Chang, D.T., Lopez, A., von Kessler, D.P., Chiang, C., Simandl, B.K., Zhao, R., Seldin, M.F., Fallon, J.F., and Beachy, P.A. (1994). Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* 120, 3339-3353.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P., and Tessier-Lavigne, M. (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113, 11-23.
- Charron, F., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132, 2251-2262.
- Chen, M.H., Gao, N., Kawakami, T., and Chuang, P.T. (2005). Mice deficient in the fused homolog do not exhibit phenotypes indicative of perturbed hedgehog signaling during embryonic development. *Mol Cell Biol* 25, 7042-7053.
- Chen, M.H., Li, Y.J., Kawakami, T., Xu, S.M., and Chuang, P.T. (2004a). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 18, 641-659.
- Chen, W., Ren, X.R., Nelson, C.D., Barak, L.S., Chen, J.K., Beachy, P.A., de Sauvage, F., and Lefkowitz, R.J. (2004b). Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* 306, 2257-2260.

RÉFÉRENCES

- Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., and Flanagan, J.G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82, 371-381.
- Cheng, S.Y., and Bishop, J.M. (2002). Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5442-5447.
- Chizhikov, V.V., and Millen, K.J. (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Dev Biol* 277, 287-295.
- Chodniewicz, D., and Klemke, R.L. (2004). Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta* 1692, 63-76.
- Chuang, P.T., and McMahon, A.P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-621.
- Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 296-306.
- Cohen, B. (1995). Nobel committee rewards pioneers of development studies in fruitflies. *Nature* 377, 465.
- Cohen, M.M., Jr. (2006). Problems in the naming of genes. *Am J Med Genet A* 140, 1483-1484.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 1014-1018.
- Colamarino, S.A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81, 621-629.
- Cole, F., and Krauss, R.S. (2003). Microform holoprosencephaly in mice that lack the Ig superfamily member Cdon. *Curr Biol* 13, 411-415.
- Cole, F., Zhang, W., Geyra, A., Kang, J.S., and Krauss, R.S. (2004). Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO. *Dev Cell* 7, 843-854.
- Cong, M., Perry, S.J., Lin, F.T., Fraser, I.D., Hu, L.A., Chen, W., Pitcher, J.A., Scott, J.D., and Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* 276, 15192-15199.
- Connor, R.M., Allen, C.L., Devine, C.A., Claxton, C., and Key, B. (2005). BOC, brother of CDO, is a dorsoventral axon-guidance molecule in the embryonic vertebrate brain. *J Comp Neurol* 485, 32-42.
- Corcoran, R.B., and Scott, M.P. (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8408-8413.
- Cote, J.F., and Vuori, K. (2007). GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol* 17, 383-393.
- Cowan, C.W., Shao, Y.R., Sahin, M., Shamah, S.M., Lin, M.Z., Greer, P.L., Gao, S., Griffith, E.C., Brugge, J.S., and Greenberg, M.E. (2005). Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron* 46, 205-217.
- Daly, R.J. (2004). Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J* 382, 13-25.
- Davies, J.P., Chen, F.W., and Ioannou, Y.A. (2000). Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* 290, 2295-2298.
- de Castro, F., Lopez-Mascaraque, L., and De Carlos, J.A. (2007). Cajal: lessons on brain development. *Brain Res Rev* 55, 481-489.
- deBakker, C.D., Haney, L.B., Kinchen, J.M., Grimsley, C., Lu, M., Klingele, D., Hsu, P.K., Chou, B.K., Cheng, L.C., Blangy, A., *et al.* (2004). Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr Biol* 14, 2208-2216.
- Del Rio, J.A., Gonzalez-Billault, C., Urena, J.M., Jimenez, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simo, S., La Torre, A., Wandosell, F., *et al.* (2004). MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol* 14, 840-850.
- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., and Cohen, S.M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521-531.
- Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.
- Dickson, B.J., and Gilestro, G.F. (2006). Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 651-675.

REFERENCES

- Ding, Q., Fukami, S., Meng, X., Nishizaki, Y., Zhang, X., Sasaki, H., Dlugosz, A., Nakafuku, M., and Hui, C. (1999). Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol* *9*, 1119-1122.
- Driessens, M.H., Hu, H., Nobes, C.D., Self, A., Jordens, I., Goodman, C.S., and Hall, A. (2001). Plexin-B semaphorin receptors interact directly with active Rac and regulate the actin cytoskeleton by activating Rho. *Curr Biol* *11*, 339-344.
- Dunaeva, M., Michelson, P., Kogerman, P., and Toftgard, R. (2003). Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins. *J Biol Chem* *278*, 5116-5122.
- Dunn, P.M. (2003). Galen (AD 129-200) of Pergamun: anatomist and experimental physiologist. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* *88*, F441-443.
- Dwyer, J.R., Sever, N., Carlson, M., Nelson, S.F., Beachy, P.A., and Parhami, F. (2007). Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem* *282*, 8959-8968.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* *75*, 1417-1430.
- Eggenchwiler, J.T., Bulgakov, O.V., Qin, J., Li, T., and Anderson, K.V. (2006). Mouse Rab23 regulates hedgehog signaling from smoothened to Gli proteins. *Dev Biol* *290*, 1-12.
- Eggenchwiler, J.T., Espinoza, E., and Anderson, K.V. (2001). Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* *412*, 194-198.
- Erickson, M.R., Galletta, B.J., and Abmayr, S.M. (1997). *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* *138*, 589-603.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* *421*, 753-756.
- Falk, J., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Puschel, A.W., *et al.* (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* *48*, 63-75.
- Fan, G., Shumay, E., Malbon, C.C., and Wang, H. (2001). c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *J Biol Chem* *276*, 13240-13247.
- Fietz, M.J., Jacinto, A., Taylor, A.M., Alexandre, C., and Ingham, P.W. (1995). Secretion of the amino-terminal fragment of the hedgehog protein is necessary and sufficient for hedgehog signalling in *Drosophila*. *Curr Biol* *5*, 643-650.
- Filmus, J. (2001). Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* *11*, 19R-23R.
- Flanagan, J.G., and Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* *21*, 309-345.
- Forbes, A.J., Nakano, Y., Taylor, A.M., and Ingham, P.W. (1993). Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. *Dev Suppl*, 115-124.
- Frame, S., and Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* *359*, 1-16.
- Fuccillo, M., Joyner, A.L., and Fishell, G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* *7*, 772-783.
- Fuccillo, M., Rallu, M., McMahon, A.P., and Fishell, G. (2004). Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning. *Development* *131*, 5031-5040.
- Gallet, A., Staccini-Lavenant, L., and Therond, P.P. (2008). Cellular trafficking of the glypican Dally-like is required for full-strength Hedgehog signaling and wingless transcytosis. *Dev Cell* *14*, 712-725.
- Gelbart, W.M. (1989). The decapentaplegic gene: a TGF-beta homologue controlling pattern formation in *Drosophila*. *Development* *107 Suppl*, 65-74.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* *23*, 175-182.
- Golgi, C., Bentivoglio, M., and Swanson, L. (2001 (1886)). On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII). 1886. *Brain Res Bull* *54*, 461-483.
- Gonzalez-Quevedo, R., Shoffer, M., Horng, L., and Oro, A.E. (2005). Receptor tyrosine phosphatase-dependent cytoskeletal remodeling by the hedgehog-responsive gene MIM/BEG4. *J Cell Biol* *168*, 453-463.

RÉFÉRENCES

- Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., and Scott, M.P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* *10*, 301-312.
- Govek, E.E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* *19*, 1-49.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* *36*, 59-74.
- Grimsley, C.M., Kinchen, J.M., Tosello-Trampont, A.C., Brugnera, E., Haney, L.B., Lu, M., Chen, Q., Klingele, D., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S. (2004). Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J Biol Chem* *279*, 6087-6097.
- Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., *et al.* (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* *107*, 27-41.
- Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* *33*, 891-895.
- Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A., and Cerione, R.A. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product. *Nature* *354*, 311-314.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., and Matsuda, M. (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol* *16*, 1770-1776.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., and Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the *eph* gene. *Science* *238*, 1717-1720.
- Hochman, E., Castiel, A., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., and Izraeli, S. (2006). Molecular pathways regulating pro-migratory effects of Hedgehog signaling. *J Biol Chem* *281*, 33860-33870.
- Hollyday, M., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1995). Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech Dev* *52*, 9-25.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* *97*, 927-941.
- Hooper, J.E., and Scott, M.P. (1989). The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* *59*, 751-765.
- Hu, H., Marton, T.F., and Goodman, C.S. (2001). Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron* *32*, 39-51.
- Huh, S., Hatini, V., Marcus, R.C., Li, S.C., and Lai, E. (1999). Dorsal-ventral patterning defects in the eye of *BF-1*-deficient mice associated with a restricted loss of *shh* expression. *Dev Biol* *211*, 53-63.
- Huveneers, S., and Danen, E.H. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* *122*, 1059-1069.
- Hynes, M., Stone, D.M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A., and Rosenthal, A. (1997). Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene *Gli-1*. *Neuron* *19*, 15-26.
- Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* *15*, 3059-3087.
- Ingham, P.W., Nystedt, S., Nakano, Y., Brown, W., Stark, D., van den Heuvel, M., and Taylor, A.M. (2000). Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr Biol* *10*, 1315-1318.
- Ingham, P.W., and Placzek, M. (2006). Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet* *7*, 841-850.
- Ingham, P.W., Taylor, A.M., and Nakano, Y. (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* *353*, 184-187.
- Ingle, E. (2008). Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* *1784*, 56-65.

REFERENCES

- Ishibashi, M., and McMahon, A.P. (2002). A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Development* *129*, 4807-4819.
- Ishii, S. (2005). Costal-2: a scaffold for kinases mediates Hedgehog signaling. *Dev Cell* *8*, 140-141.
- Ivins, J.K., Litwack, E.D., Kumbasar, A., Stipp, C.S., and Lander, A.D. (1997). Cerebroglycan, a developmentally regulated cell-surface heparan sulfate proteoglycan, is expressed on developing axons and growth cones. *Dev Biol* *184*, 320-332.
- Iwasato, T., Katoh, H., Nishimaru, H., Ishikawa, Y., Inoue, H., Saito, Y.M., Ando, R., Iwama, M., Takahashi, R., Negishi, M., *et al.* (2007). Rac-GAP alpha-chimerin regulates motor-circuit formation as a key mediator of EphrinB3/EphA4 forward signaling. *Cell* *130*, 742-753.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 247-269.
- Jenkins, R.W., Canals, D., and Hannun, Y.A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal* *21*, 836-846.
- Jensen, A.M., and Wallace, V.A. (1997). Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* *124*, 363-371.
- Jia, J., Amanai, K., Wang, G., Tang, J., Wang, B., and Jiang, J. (2002). Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus. *Nature* *416*, 548-552.
- Jia, J., Tong, C., and Jiang, J. (2003). Smoothed transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes Dev* *17*, 2709-2720.
- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L., and Jiang, J. (2004). Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* *432*, 1045-1050.
- Jin, Z., and Strittmatter, S.M. (1997). Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* *17*, 6256-6263.
- Kadison, S.R., Makinen, T., Klein, R., Henkemeyer, M., and Kaprielian, Z. (2006). EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral midline of the embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* *26*, 8909-8914.
- Kamisago, M., Kimura, M., Furutani, Y., Furutani, M., Takao, A., Momma, K., and Matsuoka, R. (1999). Assignment of human desert hedgehog gene (DHH) to chromosome band 12q13.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* *87*, 117-118.
- Kang, J.S., Bae, G.U., Yi, M.J., Yang, Y.J., Oh, J.E., Takaesu, G., Zhou, Y.T., Low, B.C., and Krauss, R.S. (2008). A Cdo-Bnip-2-Cdc42 signaling pathway regulates p38alpha/beta MAPK activity and myogenic differentiation. *J Cell Biol* *182*, 497-507.
- Kang, J.S., Feinleib, J.L., Knox, S., Ketteringham, M.A., and Krauss, R.S. (2003). Promyogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3989-3994.
- Kang, J.S., Gao, M., Feinleib, J.L., Cotter, P.D., Guadagno, S.N., and Krauss, R.S. (1997). CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *J Cell Biol* *138*, 203-213.
- Kang, J.S., Mulieri, P.J., Hu, Y., Taliana, L., and Krauss, R.S. (2002). BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *EMBO J* *21*, 114-124.
- Kang, J.S., Mulieri, P.J., Miller, C., Sassoon, D.A., and Krauss, R.S. (1998). CDO, a robo-related cell surface protein that mediates myogenic differentiation. *J Cell Biol* *143*, 403-413.
- Kang, J.S., Yi, M.J., Zhang, W., Feinleib, J.L., Cole, F., and Krauss, R.S. (2004). Netrins and neogenin promote myotube formation. *J Cell Biol* *167*, 493-504.
- Kasai, K., Takahashi, M., Osumi, N., Sinnarajah, S., Takeo, T., Ikeda, H., Kehrl, J.H., Itoh, G., and Arnheiter, H. (2004). The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signalling. *Genes Cells* *9*, 49-58.
- Katoh, H., Hiramoto, K., and Negishi, M. (2006). Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci* *119*, 56-65.
- Katoh, Y., and Katoh, M. (2004). KIF27 is one of orthologs for Drosophila Costal-2. *Int J Oncol* *25*, 1875-1880.
- Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* *78*, 425-435.
- Kenney, A.M., Cole, M.D., and Rowitch, D.H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* *130*, 15-28.

RÉFÉRENCES

- Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* *96*, 785-794.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* *92*, 205-215.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J., and Stoter, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* *17*, 675-689.
- Knoll, B., and Drescher, U. (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* *24*, 6248-6257.
- Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Unden, A.B., Sandstedt, B., Toftgard, R., and Zaphiropoulos, P.G. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* *1*, 312-319.
- Koh, C.G. (2006). Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neurosignals* *15*, 228-237.
- Komander, D., Patel, M., Laurin, M., Fradet, N., Pelletier, A., Barford, D., and Cote, J.F. (2008). An Alpha-Helical Extension of the ELMO1 Pleckstrin Homology Domain Mediates Direct Interaction to DOCK180 and Is Critical in Rac Signaling. *Mol Biol Cell*.
- Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., and Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* *17*, 1201-1211.
- Krauss, S., Concordet, J.P., and Ingham, P.W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* *75*, 1431-1444.
- Kubota, C., Nagano, T., Baba, H., and Sato, M. (2004). Netrin-1 is crucial for the establishment of the dorsal column-medial lemniscal system. *J Neurochem* *89*, 1547-1554.
- Kumar, S., Balczarek, K.A., and Lai, Z.C. (1996). Evolution of the hedgehog gene family. *Genetics* *142*, 965-972.
- Kuramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. (2009). Regulation of dendrite growth by the Cdc42 activator Zizimin1/Dock9 in hippocampal neurons. *J Neurosci Res* *87*, 1794-1805.
- Kurokawa, K., Nakamura, T., Aoki, K., and Matsuda, M. (2005). Mechanism and role of localized activation of Rho-family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells. *Biochem Soc Trans* *33*, 631-634.
- Lanzetti, L., Rybin, V., Malabarba, M.G., Christoforidis, S., Scita, G., Zerial, M., and Di Fiore, P.P. (2000). The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* *408*, 374-377.
- Lauth, M., and Toftgard, R. (2007). Non-canonical activation of GLI transcription factors: implications for targeted anti-cancer therapy. *Cell Cycle* *6*, 2458-2463.
- Lee, C.S., Buttitta, L., and Fan, C.M. (2001). Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11347-11352.
- Lee, J., Platt, K.A., Censullo, P., and Ruiz i Altaba, A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* *124*, 2537-2552.
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., and Beachy, P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* *266*, 1528-1537.
- Lee, K.J., and Jessell, T.M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* *22*, 261-294.
- Lee, K.J., Mendelsohn, M., and Jessell, T.M. (1998). Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes Dev* *12*, 3394-3407.
- Lee, S.H., Kerff, F., Chereau, D., Ferron, F., Klug, A., and Dominguez, R. (2007). Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. *Structure* *15*, 145-155.
- Leeuwen, F.N., Kain, H.E., Kammen, R.A., Michiels, F., Kranenburg, O.W., and Collard, J.G. (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol* *139*, 797-807.
- Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahon, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jacques, B., and McMahon, A.P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* *105*, 599-612.

RÉFÉRENCES

- Li, W., Lee, J., Vikis, H.G., Lee, S.H., Liu, G., Aurandt, J., Shen, T.L., Fearon, E.R., Guan, J.L., Han, M., *et al.* (2004). Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci* 7, 1213-1221.
- Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., and Rao, Y. (2008). Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci* 11, 28-35.
- Li, X., Meriane, M., Triki, I., Shekarabi, M., Kennedy, T.E., Larose, L., and Lamarche-Vane, N. (2002). The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism. *J Biol Chem* 277, 37788-37797.
- Li, Y., Zhang, H., Litingtung, Y., and Chiang, C. (2006). Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6548-6553.
- Liu, G., Beggs, H., Jurgensen, C., Park, H.T., Tang, H., Gorski, J., Jones, K.R., Reichardt, L.F., Wu, J., and Rao, Y. (2004). Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nat Neurosci* 7, 1222-1232.
- Liu, G., Li, W., Gao, X., Li, X., Jurgensen, C., Park, H.T., Shin, N.Y., Yu, J., He, M.L., Hanks, S.K., *et al.* (2007). p130CAS is required for netrin signaling and commissural axon guidance. *J Neurosci* 27, 957-968.
- Liu, Y., May, N.R., and Fan, C.M. (2001). Growth arrest specific gene 1 is a positive growth regulator for the cerebellum. *Dev Biol* 236, 30-45.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1997). *Biologie moléculaire de la cellule* (Chapitre 22: "Microfilaments: Motilité cellulaire et ajustement de la forme de la cellule"), Troisième édition edn (DeBoeck Université).
- Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M.A., Tagle, D.A., *et al.* (1997). Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277, 232-235.
- Low, W.C., Wang, C., Pan, Y., Huang, X.Y., Chen, J.K., and Wang, B. (2008). The decoupling of Smoothed from Galphai proteins has little effect on Gli3 protein processing and Hedgehog-regulated chick neural tube patterning. *Dev Biol* 321, 188-196.
- Lowery, L.A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 332-343.
- Lum, L., and Beachy, P.A. (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 304, 1755-1759.
- Lum, L., Yao, S., Mozer, B., Rovescalli, A., Von Kessler, D., Nirenberg, M., and Beachy, P.A. (2003a). Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* 299, 2039-2045.
- Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R.K., von Kessler, D.P., Taipale, J., Weis-Garcia, F., Gong, R., Wang, B., and Beachy, P.A. (2003b). Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol Cell* 12, 1261-1274.
- Luo, Y., Raible, D., and Raper, J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.
- Luttrell, D.K., and Luttrell, L.M. (2004). Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* 23, 7969-7978.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., *et al.* (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.
- Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465.
- Lyuksytova, A.I., Lu, C.C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M., and Zou, Y. (2003). Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302, 1984-1988.
- Ma, Y., Erkner, A., Gong, R., Yao, S., Taipale, J., Basler, K., and Beachy, P.A. (2002). Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of Dispatched. *Cell* 111, 63-75.
- Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., and Huang, X.Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102, 635-646.

RÉFÉRENCES

- Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 8, 1347-1356.
- Machesky, L.M., and Johnston, S.A. (2007). MIM: a multifunctional scaffold protein. *J Mol Med* 85, 569-576.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M.D., Nery, S., Corbin, J.G., Gritti-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J.A., Rubin, L.L., *et al.* (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39, 937-950.
- Maclean, K. (2006). Humour of gene names lost in translation to patients. *Nature* 439, 266.
- Marignani, P.A., and Carpenter, C.L. (2001). Vav2 is required for cell spreading. *J Cell Biol* 154, 177-186.
- Marigo, V., Roberts, D.J., Lee, S.M., Tsukurov, O., Levi, T., Gastier, J.M., Epstein, D.J., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Seidman, C.E., *et al.* (1995). Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28, 44-51.
- Marti, E., and Bovolenta, P. (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 25, 89-96.
- Martin, V., Carrillo, G., Torroja, C., and Guerrero, I. (2001). The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol* 11, 601-607.
- Martinelli, D.C., and Fan, C.M. (2007a). Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev* 21, 1231-1243.
- Martinelli, D.C., and Fan, C.M. (2007b). The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle* 6, 2650-2655.
- Matsuo, N., Hoshino, M., Yoshizawa, M., and Nabeshima, Y. (2002). Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth. *J Biol Chem* 277, 2860-2868.
- Mattila, P.K., Pykalainen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V.O., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Lappalainen, P. (2007). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol* 176, 953-964.
- Mattila, P.K., Salminen, M., Yamashiro, T., and Lappalainen, P. (2003). Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J Biol Chem* 278, 8452-8459.
- McCarthy, R.A., Barth, J.L., Chintalapudi, M.R., Knaak, C., and Argraves, W.S. (2002). Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *J Biol Chem* 277, 25660-25667.
- McLellan, J.S., Yao, S., Zheng, X., Geisbrecht, B.V., Ghirlando, R., Beachy, P.A., and Leahy, D.J. (2006). Structure of a heparin-dependent complex of Hedgehog and Ihog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17208-17213.
- Meloni, A.R., Fralish, G.B., Kelly, P., Salahpour, A., Chen, J.K., Wechsler-Reya, R.J., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (2006). Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Biol* 26, 7550-7560.
- Menesini Chen, M.G., Chen, J.S., and Levi-Montalcini, R. (1978). Sympathetic nerve fibers ingrowth in the central nervous system of neonatal rodent upon intracerebral NGF injections. *Arch Ital Biol* 116, 53-84.
- Merchant, M., Evangelista, M., Luoh, S.M., Frantz, G.D., Chalasani, S., Carano, R.A., van Hoy, M., Ramirez, J., Ogasawara, A.K., McFarland, L.M., *et al.* (2005). Loss of the serine/threonine kinase fused results in postnatal growth defects and lethality due to progressive hydrocephalus. *Mol Cell Biol* 25, 7054-7068.
- Meriane, M., Tcherkezian, J., Webber, C.A., Danek, E.I., Triki, I., McFarlane, S., Bloch-Gallego, E., and Lamarche-Vane, N. (2004). Phosphorylation of DCC by Fyn mediates Netrin-1 signaling in growth cone guidance. *J Cell Biol* 167, 687-698.
- Methot, N., and Basler, K. (2000). Suppressor of fused opposes hedgehog signal transduction by impeding nuclear accumulation of the activator form of Cubitus interruptus. *Development* 127, 4001-4010.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., and Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7004-7011.
- Miki, H., and Takenawa, T. (2003). Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem* 134, 309-313.
- Miller, L.J. (2008). G protein-coupled receptor structures, molecular associations, and modes of regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 1-5.

RÉFÉRENCES

- Miller, W.E., Maudsley, S., Ahn, S., Khan, K.D., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2000). beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem* 275, 11312-11319.
- Mittal, R., and McMahon, H.T. (2009). Arrestins as adaptors for ubiquitination in endocytosis and sorting. *EMBO Rep* 10, 41-43.
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J., and Itoh, H. (2003). Src kinase regulates the activation of a novel FGD-1-related Cdc42 guanine nucleotide exchange factor in the signaling pathway from the endothelin A receptor to JNK. *J Biol Chem* 278, 29890-29900.
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Sanbe, A., and Tanoue, A. (2007). Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Exp Cell Res* 313, 791-804.
- Mohler, J. (1988). Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* 120, 1061-1072.
- Mulieri, P.J., Kang, J.S., Sassoon, D.A., and Krauss, R.S. (2002). Expression of the boc gene during murine embryogenesis. *Dev Dyn* 223, 379-388.
- Mulieri, P.J., Okada, A., Sassoon, D.A., McConnell, S.K., and Krauss, R.S. (2000). Developmental expression pattern of the cdo gene. *Dev Dyn* 219, 40-49.
- Murai, K.K., and Pasquale, E.B. (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116, 2823-2832.
- Murone, M., Rosenthal, A., and de Sauvage, F.J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Curr Biol* 9, 76-84.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H., and Takada, S. (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev* 16, 548-553.
- Nakamura, T., Aoki, K., and Matsuda, M. (2005). FRET imaging in nerve growth cones reveals a high level of RhoA activity within the peripheral domain. *Brain Res Mol Brain Res* 139, 277-287.
- Nakamura, T., Komiya, M., Sone, K., Hirose, E., Gotoh, N., Morii, H., Ohta, Y., and Mori, N. (2002). Grit, a GTPase-activating protein for the Rho family, regulates neurite extension through association with the TrkA receptor and N-Shc and CrkL/Crk adapter molecules. *Mol Cell Biol* 22, 8721-8734.
- Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J.R., and Ingham, P.W. (1989). A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched. *Nature* 341, 508-513.
- Nakashiba, T., Ikeda, T., Nishimura, S., Tashiro, K., Honjo, T., Culotti, J.G., and Itoharu, S. (2000). Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J Neurosci* 20, 6540-6550.
- Nasu-Nishimura, Y., Hayashi, T., Ohishi, T., Okabe, T., Ohwada, S., Hasegawa, Y., Senda, T., Toyoshima, C., Nakamura, T., and Akiyama, T. (2006). Role of the Rho GTPase-activating protein RICS in neurite outgrowth. *Genes Cells* 11, 607-614.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Nybakken, K.E., Turck, C.W., Robbins, D.J., and Bishop, J.M. (2002). Hedgehog-stimulated phosphorylation of the kinesin-related protein Costal2 is mediated by the serine/threonine kinase fused. *J Biol Chem* 277, 24638-24647.
- Ogden, S.K., Ascano, M., Jr., Stegman, M.A., Suber, L.M., Hooper, J.E., and Robbins, D.J. (2003). Identification of a functional interaction between the transmembrane protein Smoothened and the kinesin-related protein Costal2. *Curr Biol* 13, 1998-2003.
- Ogden, S.K., Fei, D.L., Schilling, N.S., Ahmed, Y.F., Hwa, J., and Robbins, D.J. (2008). G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling. *Nature* 456, 967-970.
- Oh, J.E., Bae, G.U., Yang, Y.J., Yi, M.J., Lee, H.J., Kim, B.G., Krauss, R.S., and Kang, J.S. (2009). Cdo promotes neuronal differentiation via activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J*.
- Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D.S., Wong, K., Fabre, P.J., Tessier-Lavigne, M., and McConnell, S.K. (2006). Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444, 369-373.

RÉFÉRENCES

- Orentas, D.M., Hayes, J.E., Dyer, K.L., and Miller, R.H. (1999). Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* *126*, 2419-2429.
- Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K.S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U., and Klein, R. (2002). EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* *9*, 725-737.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., and Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* *26*, 3365-3377.
- Pan, Y., Wang, C., and Wang, B. (2009). Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol* *326*, 177-189.
- Pearse, R.V., 2nd, Collier, L.S., Scott, M.P., and Tabin, C.J. (1999). Vertebrate homologs of Drosophila suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol* *212*, 323-336.
- Penela, P., Ribas, C., and Mayor, F., Jr. (2003). Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* *15*, 973-981.
- Pham, A., Therond, P., Alves, G., Tournier, F.B., Busson, D., Lamour-Isnard, C., Bouchon, B.L., Preat, T., and Tricoire, H. (1995). The Suppressor of fused gene encodes a novel PEST protein involved in Drosophila segment polarity establishment. *Genetics* *140*, 587-598.
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., and Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* *67*, 653-692.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T., and Dodd, J. (1990a). Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development* *110*, 19-30.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., and Dodd, J. (1990b). Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* *250*, 985-988.
- Playford, M.P., and Schaller, M.D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* *23*, 7928-7946.
- Poncet, C., Soula, C., Trousse, F., Kan, P., Hirsinger, E., Pourquie, O., Duprat, A.M., and Cochard, P. (1996). Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech Dev* *60*, 13-32.
- Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Lee, J.J., Moses, K., and Beachy, P.A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* *374*, 363-366.
- Preat, T. (1992). Characterization of Suppressor of fused, a complete suppressor of the fused segment polarity gene of Drosophila melanogaster. *Genetics* *132*, 725-736.
- Preat, T., Therond, P., Lamour-Isnard, C., Limbourg-Bouchon, B., Tricoire, H., Erk, I., Mariol, M.C., and Busson, D. (1990). A putative serine/threonine protein kinase encoded by the segment-polarity fused gene of Drosophila. *Nature* *347*, 87-89.
- Preat, T., Therond, P., Limbourg-Bouchon, B., Pham, A., Tricoire, H., Busson, D., and Lamour-Isnard, C. (1993). Segmental polarity in Drosophila melanogaster: genetic dissection of fused in a Suppressor of fused background reveals interaction with costal-2. *Genetics* *135*, 1047-1062.
- Price, M.A., and Kalderon, D. (1999). Proteolysis of cubitus interruptus in Drosophila requires phosphorylation by protein kinase A. *Development* *126*, 4331-4339.
- Price, M.A., and Kalderon, D. (2002). Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase I. *Cell* *108*, 823-835.
- Pringle, N.P., Yu, W.P., Guthrie, S., Roelink, H., Lumsden, A., Peterson, A.C., and Richardson, W.D. (1996). Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* *177*, 30-42.
- Pulido, R., Krueger, N.X., Serra-Pages, C., Saito, H., and Streuli, M. (1995). Molecular characterization of the human transmembrane protein-tyrosine phosphatase delta. Evidence for tissue-specific expression of alternative human transmembrane protein-tyrosine phosphatase delta isoforms. *J Biol Chem* *270*, 6722-6728.
- Raper, J.A. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* *10*, 88-94.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* *75*, 1401-1416.

RÉFÉRENCES

- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389-399.
- Riobo, N.A., and Manning, D.R. (2007). Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J* *403*, 369-379.
- Robles, E., and Gomez, T.M. (2006). Focal adhesion kinase signaling at sites of integrin-mediated adhesion controls axon pathfinding. *Nat Neurosci* *9*, 1274-1283.
- Robles, E., Woo, S., and Gomez, T.M. (2005). Src-dependent tyrosine phosphorylation at the tips of growth cone filopodia promotes extension. *J Neurosci* *25*, 7669-7681.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.C., and Muenke, M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* *14*, 357-360.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* *234*, 364-368.
- Ronca, F., Andersen, J.S., Paech, V., and Margolis, R.U. (2001). Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *J Biol Chem* *276*, 29141-29147.
- Rothberg, J.M., Jacobs, J.R., Goodman, C.S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* *4*, 2169-2187.
- Ruel, L., Gallet, A., Raisin, S., Truchi, A., Staccini-Lavenant, L., Cervantes, A., and Therond, P.P. (2007). Phosphorylation of the atypical kinesin Costal2 by the kinase Fused induces the partial disassembly of the Smoothened-Fused-Costal2-Cubitus interruptus complex in Hedgehog signalling. *Development* *134*, 3677-3689.
- Ruiz-Gomez, A., Molnar, C., Holguin, H., Mayor, F., Jr., and de Celis, J.F. (2007). The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim Biophys Acta* *1768*, 901-912.
- Ruppert, J.M., Vogelstein, B., Arheden, K., and Kinzler, K.W. (1990). GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Mol Cell Biol* *10*, 5408-5415.
- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S.M., Michelson, A.M., and Bate, M. (1995). Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for Drosophila muscle development. *Development* *121*, 1979-1988.
- Sarnago, S., Elorza, A., and Mayor, F., Jr. (1999). Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* *274*, 34411-34416.
- Schroepfer, G.J., Jr. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* *80*, 361-554.
- Scott, C., and Ioannou, Y.A. (2004). The NPC1 protein: structure implies function. *Biochim Biophys Acta* *1685*, 8-13.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C.S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* *10*, 409-426.
- Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* *87*, 1001-1014.
- Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* *78*, 409-424.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* *16*, 869-871.
- Shaw, M., and Cohen, P. (1999). Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* *461*, 120-124.
- Shyamala, B.V., and Bhat, K.M. (2002). A positive role for patched-smoothened signaling in promoting cell proliferation during normal head development in Drosophila. *Development* *129*, 1839-1847.
- Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K., and Scott, M.P. (1997). Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* *90*, 235-245.
- Smelkinson, M.G., and Kalderon, D. (2006). Processing of the Drosophila hedgehog signaling effector Ci-155 to the repressor Ci-75 is mediated by direct binding to the SCF component Slimb. *Curr Biol* *16*, 110-116.

REFERENCES

- Sperry, R.W. (1963). Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* *50*, 703-710.
- Spoelgen, R., Hammes, A., Anzenberger, U., Zechner, D., Andersen, O.M., Jerchow, B., and Willnow, T.E. (2005). LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development* *132*, 405-414.
- Stegman, M.A., Vallance, J.E., Elangovan, G., Sosinski, J., Cheng, Y., and Robbins, D.J. (2000). Identification of a tetrameric hedgehog signaling complex. *J Biol Chem* *275*, 21809-21812.
- Stern, C.D. (2005). Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* *132*, 2007-2021.
- Stigliano, I., Puricelli, L., Filmus, J., Sogayar, M.C., Bal de Kier Joffe, E., and Peters, M.G. (2009). Glypican-3 regulates migration, adhesion and actin cytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation. *Breast Cancer Res Treat* *114*, 251-262.
- Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., *et al.* (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* *384*, 129-134.
- Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002). Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell* *3*, 645-658.
- Svard, J., Heby-Henricson, K., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., Bergstrom, A., Ericson, J., Toftgard, R., and Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* *10*, 187-197.
- Swiercz, J.M., Kuner, R., and Offermanns, S. (2004). Plexin-B1/RhoGEF-mediated RhoA activation involves the receptor tyrosine kinase ErbB-2. *J Cell Biol* *165*, 869-880.
- Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* *418*, 892-897.
- Takaesu, G., Kang, J.S., Bae, G.U., Yi, M.J., Lee, C.M., Reddy, E.P., and Krauss, R.S. (2006). Activation of p38alpha/beta MAPK in myogenesis via binding of the scaffold protein JLP to the cell surface protein Cdo. *J Cell Biol* *175*, 383-388.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* *81*, 153-208.
- Tay, S.Y., Ingham, P.W., and Roy, S. (2005). A homologue of the *Drosophila* kinesin-like protein Costal2 regulates Hedgehog signal transduction in the vertebrate embryo. *Development* *132*, 625-634.
- Taylor, F.R., Wen, D., Garber, E.A., Carmillo, A.N., Baker, D.P., Arduini, R.M., Williams, K.P., Weinreb, P.H., Rayhorn, P., Hronowski, X., *et al.* (2001). Enhanced potency of human Sonic hedgehog by hydrophobic modification. *Biochemistry* *40*, 4359-4371.
- Tcherkezian, J., and Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* *99*, 67-86.
- ten Klooster, J.P., Jaffer, Z.M., Chernoff, J., and Hordijk, P.L. (2006). Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* *172*, 759-769.
- Tenzen, T., Allen, B.L., Cole, F., Kang, J.S., Krauss, R.S., and McMahon, A.P. (2006). The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* *10*, 647-656.
- Tessier-Lavigne, M. (1995). Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell* *82*, 345-348.
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A.G., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* *336*, 775-778.
- Therond, P.P., Knight, J.D., Kornberg, T.B., and Bishop, J.M. (1996). Phosphorylation of the fused protein kinase in response to signaling from hedgehog. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4224-4228.
- Tiniakow, G.G., and Terentjeva, E.L. (1933). Cubitus Interruptus, a New Genovariation of the Fourth Chromosome of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* *18*, 117-120.
- Tohgo, A., Pierce, K.L., Choy, E.W., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* *277*, 9429-9436.

RÉFÉRENCES

- Tong, J., Killeen, M., Steven, R., Binns, K.L., Culotti, J., and Pawson, T. (2001). Netrin stimulates tyrosine phosphorylation of the UNC-5 family of netrin receptors and induces Shp2 binding to the RCM cytodomain. *J Biol Chem* *276*, 40917-40925.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., and Saier, M.H., Jr. (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* *1*, 107-125.
- Vaillant, C., Michos, O., Orolicki, S., Brellier, F., Taieb, S., Moreno, E., Te, H., Zeller, R., and Monard, D. (2007). Protease nexin 1 and its receptor LRP modulate SHH signalling during cerebellar development. *Development* *134*, 1745-1754.
- van Straaten, H.W., Thors, F., Wiertz-Hoessels, L., Hekking, J., and Drukker, J. (1985). Effect of a notochordal implant on the early morphogenesis of the neural tube and neuroblasts: histometrical and histological results. *Dev Biol* *110*, 247-254.
- Von Ohlen, T., Lessing, D., Nusse, R., and Hooper, J.E. (1997). Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 2404-2409.
- Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1995). Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix. *J Biol Chem* *270*, 22259-22262.
- Wallace, V.A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* *9*, 445-448.
- Walthall, S.L., Moses, M., and Horabin, J.I. (2007). A large complex containing Patched and Smoothed initiates Hedgehog signaling in *Drosophila*. *J Cell Sci* *120*, 826-837.
- Wegorzewska, M., Krauss, R.S., and Kang, J.S. (2003). Overexpression of the immunoglobulin superfamily members CDO and BOC enhances differentiation of the human rhabdomyosarcoma cell line RD. *Mol Carcinog* *37*, 1-4.
- Williams, S.E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D.J., Gale, N.W., Holt, C.E., Mason, C.A., and Henkemeyer, M. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* *39*, 919-935.
- Wong, E.V., Kerner, J.A., and Jay, D.G. (2004). Convergent and divergent signaling mechanisms of growth cone collapse by ephrinA5 and slit2. *J Neurobiol* *59*, 66-81.
- Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., *et al.* (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* *107*, 209-221.
- Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* *9*, 2431-2438.
- Woodings, J.A., Sharp, S.J., and Machesky, L.M. (2003). MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. *Biochem J* *371*, 463-471.
- Worley, T., and Holt, C. (1996). Inhibition of protein tyrosine kinases impairs axon extension in the embryonic optic tract. *J Neurosci* *16*, 2294-2306.
- Wu, Y.C., Cheng, T.W., Lee, M.C., and Weng, N.Y. (2002). Distinct rac activation pathways control *Caenorhabditis elegans* cell migration and axon outgrowth. *Dev Biol* *250*, 145-155.
- Wu, Y.C., and Horvitz, H.R. (1998). *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* *392*, 501-504.
- Wu, Y.C., Tsai, M.C., Cheng, L.C., Chou, C.J., and Weng, N.Y. (2001). *C. elegans* CED-12 acts in the conserved crkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment. *Dev Cell* *1*, 491-502.
- Xu, N.J., and Henkemeyer, M. (2009). Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nat Neurosci* *12*, 268-276.
- Yam, P., Langlois, S., Morin, S., and Charron, F. (2009 in press). Sonic hedgehog guides axons through a non-canonical, Src family kinase-dependent signaling pathway. *Neuron*.
- Yamada, T., Pfaff, S.L., Edlund, T., and Jessell, T.M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* *73*, 673-686.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* *64*, 635-647.

RÉFÉRENCES

- Yamagishi, A., Masuda, M., Ohki, T., Onishi, H., and Mochizuki, N. (2004). A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem* *279*, 14929-14936.
- Yamaguchi, Y., Katoh, H., Yasui, H., Mori, K., and Negishi, M. (2001). RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* *276*, 18977-18983.
- Yao, S., Lum, L., and Beachy, P. (2006). The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* *125*, 343-357.
- Yin, Y., Sanes, J.R., and Miner, J.H. (2000). Identification and expression of mouse netrin-4. *Mech Dev* *96*, 115-119.
- Yokoyama, N., Romero, M.I., Cowan, C.A., Galvan, P., Helmbacher, F., Charnay, P., Parada, L.F., and Henkemeyer, M. (2001). Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline. *Neuron* *29*, 85-97.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R.D., Kokel, M., and Thomas, J.B. (2003). Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* *422*, 583-588.
- Yue, S., Chen, Y., and Cheng, S.Y. (2009). Hedgehog signaling promotes the degradation of tumor suppressor Sufu through the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* *28*, 492-499.
- Yuseff, M.I., Farfan, P., Bu, G., and Marzolo, M.P. (2007). A cytoplasmic PPPSP motif determines megalin's phosphorylation and regulates receptor's recycling and surface expression. *Traffic* *8*, 1215-1230.
- Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J., Jr., Schreiner, C.M., and Robbins, D.J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* *411*, 716-720.
- Zhang, C., Williams, E.H., Guo, Y., Lum, L., and Beachy, P.A. (2004). Extensive phosphorylation of Smoothed in Hedgehog pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17900-17907.
- Zhang, W., Kang, J.S., Cole, F., Yi, M.J., and Krauss, R.S. (2006a). Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Dev Cell* *10*, 657-665.
- Zhang, W., Yi, M.J., Chen, X., Cole, F., Krauss, R.S., and Kang, J.S. (2006b). Cortical thinning and hydrocephalus in mice lacking the immunoglobulin superfamily member CDO. *Mol Cell Biol* *26*, 3764-3772.
- Zhang, W., Zhao, Y., Tong, C., Wang, G., Wang, B., Jia, J., and Jiang, J. (2005). Hedgehog-regulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of Cubitus interruptus. *Dev Cell* *8*, 267-278.
- Zhang, X.M., and Yang, X.J. (2001a). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* *128*, 943-957.
- Zhang, X.M., and Yang, X.J. (2001b). Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Dev Biol* *233*, 271-290.
- Zhao, Y., Tong, C., and Jiang, J. (2007). Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* *450*, 252-258.
- Zhou, Q., Apionishev, S., and Kalderon, D. (2006). The contributions of protein kinase A and smoothed phosphorylation to hedgehog signal transduction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *173*, 2049-2062.
- Zisch, A.H., Kalo, M.S., Chong, L.D., and Pasquale, E.B. (1998). Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* *16*, 2657-2670.
- Zou, Y., Stoeckli, E., Chen, H., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* *102*, 363-375.